



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

APLICAÇÃO DE TERAPIA REGENERATIVA MEDIANTE RECURSO A CÉLULAS  
ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS EM CAVALOS DE DESPORTO: MENÇÃO DE DOIS  
CASOS CLÍNICOS COM DIAGNÓSTICO A NÍVEL ARTICULAR E TENDINOSO

LÚCIA ESPÍRITO SANTO BÉRTOLO FÉTEIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR  
Dr. Manuel Argenis Torrealba Hernández

Presidente:  
Prof. Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

CO-ORIENTADOR  
Prof. Doutora Paula Alexandra  
Botelho Garcia de Andrade Pimenta Tilley

Vogais:  
Prof. Doutor Fernando António da Costa Ferreira  
Prof. Doutora Paula Alexandra  
Botelho Garcia de Andrade Pimenta Tilley  
Dr. Manuel Argenis Torrealba Hernández

2013

LISBOA

---



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

APLICAÇÃO DE TERAPIA REGENERATIVA MEDIANTE RECURSO A CÉLULAS  
ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS EM CAVALOS DE DESPORTO: MENÇÃO DE DOIS  
CASOS CLÍNICOS COM DIAGNÓSTICO A NÍVEL ARTICULAR E TENDINOSO

LÚCIA ESPÍRITO SANTO BÉRTOLO FÉTEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Dr. Manuel Argenis Torrealba Hernández

Presidente:

Prof. Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

CO-ORIENTADOR

Prof. Doutora Paula Alexandra  
Botelho Garcia de Andrade Pimenta Tilley

Vogais:

Prof. Doutor Fernando António da Costa Ferreira

Prof. Doutora Paula Alexandra

Botelho Garcia de Andrade Pimenta Tilley

Dr. Manuel Argenis Torrealba Hernández

2013

LISBOA

---





## Agradecimentos

Ao Dr. Manuel Torrealba, pela possibilidade de estagiar no *Hippiatrica – Equine Medical Center*, por toda a preocupação e disponibilidade demonstradas durante o estágio e realização da dissertação, bem como por toda a exigência e responsabilidade pedidas, à semelhança do profissionalismo por si demonstrado.

À Professora Doutora Paula Tilley, por toda a simpatia, apoio e disponibilidade como professora coorientadora. Obrigado pela paciência e esforço aquando da realização da dissertação.

À Dr<sup>a</sup>. Ana Ferreira, parte integrante e fundamental do corpo clínico do *Hippiatrica – Equine Medical Center*, por toda a amizade, simpatia e generosidade demonstradas durante o estágio. Obrigado pela preocupação, compreensão e profissionalismo revelados, princípios tão importantes e atentamente registados por todos os estagiários.

À Dr<sup>a</sup>. Ana Caetano, por toda a ajuda, apoio e compreensão demonstrados. Muito obrigado por toda a disponibilidade, humor e momentos de desabafo, imprescindíveis durante os meses de realização da dissertação.

Aos internos, estagiários, professores da Universidade de Gent e colegas *ERASMUS* pelo acompanhamento, apoio e conhecimentos que me transmitiram durante esta fase do estágio, bem como pela forma como me aceitaram e integraram mesmo sendo aluna estrangeira.

Às minhas amigas que me acompanharam durante estes anos de curso, muito obrigada pela paciência, companheirismo e momentos inesquecíveis, que espero que tenham sido apenas os primeiros de muitos outros ao longo da nossa vida.

Aos meus colegas e amigos estagiários do *Hippiatrica – Equine Medical Center*, por todos os bons momentos, por toda a paciência, todo o apoio e companheirismo, durante o estágio e durante a realização da dissertação.

À minha grande amiga Maria João, por, desde sempre, ter estado presente em todos os momentos. Obrigada pela tua amizade!

Por fim, à minha família, em especial ao meu pai, mãe e irmão, por serem o meu pilar e por sempre me terem apoiado em tudo. Obrigado aos meus pais, por me terem educado segundo princípios que tanto preservo e por terem proporcionado tudo o que tenho. Muito obrigado!

## **Resumo**

**Título: Aplicação de terapia regenerativa mediante recurso a células estaminais mesenquimatosas em cavalos de desporto: menção de dois casos clínicos com diagnóstico a nível articular e tendinoso**

As lesões em tendões e articulações dos membros são causas frequentes de retirada antecipada de cavalos de desporto. Isto sucede, sobretudo, devido a uma incapacidade de retoma da performance anterior e a um maior risco de recidivas.

Os tratamentos descritos para tais lesões não têm demonstrado grande eficácia, principalmente, no que respeita à qualidade do tecido de reparação, que se pretende o mais próximo ao tecido normal (regeneração).

Nos últimos anos e tendo em vista a recuperação destes tecidos, verificou-se o crescente interesse no potencial uso das células estaminais, como terapia regenerativa. As células estaminais mesenquimatosas (MSCs), presentes no animal adulto, podem ter várias origens e podem ser aplicadas como terapia autóloga, dentro de poucos dias após a lesão. No entanto, ainda não são conhecidos quais os seus efeitos numa lesão, se efetivamente ocorre regeneração ou se as células apresentam outras ações.

Neste âmbito, são apresentados dois casos clínicos de lesões em cavalos, tendo sido aplicada terapia com recurso a células estaminais de origem adiposa. Visando constatar quais os resultados desta terapia e se constitui uma alternativa de tratamento, bem como os aspetos relativos à sua praticabilidade no quotidiano de uma clínica dedicada à medicina equina desportiva, verificou-se que ambos os animais intervencionados apresentaram melhorias no seu estado clínico, retomando as performances anteriores.

Não foi possível realizar-se um acompanhamento mais rigoroso dos animais, sobretudo, no que diz respeito aos exames de controlo, reflexo da dificuldade de conjugar a disponibilidade dos proprietários, as exigências desportivas e o interesse científico.

Todavia, embora se relatem apenas dois casos este trabalho permitiu acrescentar evidências clínicas positivas da utilização das MSCs, mostrando potencial como alternativas aos tratamentos convencionais.

**Palavras-chave:** equino; células estaminais mesenquimatosas; tendão; articulação

## **Abstract**

### **Title - The practical applicability of mesenchymal stem cells regenerative therapy on sport horses: two clinical studies of joint and tendon lesions**

Tendon and joint lesions are a frequent cause of early retirement for the sport horse. This is due, especially, to its inability to return to the previous performance and the high risk of reinjury.

The conventional treatments for these lesions are not proving effective enough in regards to the quality of the reparative tissue, which would be expected to be similar to normal tissue (regeneration).

Recently, the interest on the potential use of mesenchymal stem cells (MSCs) as a regenerative therapy for a better healing result has grown. On an adult animal, the MSCs can have different origins and can be injected as an autologous therapy, just a few days after the injury. However, it is not known what its effects are on lesions, if regeneration thus occurs or if cells perform other actions.

Two clinical studies on those types of injuries are presented, detailing the application of stem cells collected from fat tissue. Aiming to understand the therapy results, its applicability as an alternative treatment and the practical aspects of implementing it in a sports horse's clinic, the study concluded that both animals got better and returned to their previous competition level.

A better follow-up on the animal's recovery, especially the ultrasound exams, was not possible due to the difficult task of managing the owner's availability with both the sports' demands and the scientific interests.

Nevertheless, although only two cases were presented, this work contributed with some positive clinical evidence on the application of MSCs as a potential alternative treatment to the conventional approaches.

**Keywords:** equine; mesenchymal stem cells; tendon; joint

## Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Índice Geral .....	iv
Índice de Figuras .....	vi
Índice de Tabelas .....	vii
Índice de Anexos .....	viii
Índice de Abreviaturas .....	ix
Índice de Símbolos .....	xi
Breve descrição das atividades desenvolvidas no estágio curricular .....	1
Introdução.....	5
I. Revisão bibliográfica .....	7
1. Células estaminais.....	7
1.1. Caracterização das células estaminais mesenquimatosas .....	11
1.2. Propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras das células estaminais .....	13
2. Diferentes origens das células estaminais mesenquimatosas .....	16
2.1. Células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula-óssea.....	17
2.2. Células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo .....	18
2.3. Células estaminais mesenquimatosas derivadas do cordão umbilical (sangue e Wharton's Jelly) e do líquido amniótico .....	19
2.4. Células estaminais mesenquimatosas presentes no sangue periférico.....	20
2.5. Células estaminais mesenquimatosas derivadas de tendões .....	20
2.6. Células estaminais mesenquimatosas sinoviais .....	21
2.7. Células estaminais mesenquimatosas derivadas da pele .....	22
2.8. Concentrados de células estaminais mesenquimatosas.....	22
3. Vantagens e inconvenientes das células estaminais mesenquimatosas em função da sua origem .....	23
4. Isolamento e cultura de células estaminais mesenquimatosas .....	27



5. Viabilidade das células estaminais mesenquimatosas .....	30
6. Generalidades sobre articulações, tendões e ligamentos .....	30
6.1 Anatomia e fisiologia das articulações.....	31
6.2 Anatomia e fisiologia de tendões e ligamentos.....	42
6.3 Princípios gerais do diagnóstico de afeções articulares, tendinosas e ligamentosas .....	50
6.4 Princípios gerais do tratamento de articulações, tendões e ligamentos.....	64
7. Aplicação de terapias regenerativas celulares na doença articular de equinos .....	69
8. Aplicação de terapias regenerativas celulares em lesões de tendões e ligamentos 74	
9. Aplicação de terapias regenerativas celulares na reparação óssea .....	80
10. Atualidade das terapias regenerativas celulares .....	82
II. Estudo retrospectivo de dois casos clínicos com aplicação de MSCs .....	83
Discussão .....	91
Conclusão.....	95
Bibliografia.....	98
Anexos .....	105

## Índice de Figuras

Figura 1: Ilustração hierárquica do potencial de diferenciação das células estaminais .....	10
Figura 2: Representação da estrutura das diartroses.....	32
Figura 3: Estrutura do tendão .....	45
Figura 4: Imagem ecográfica transversal da lesão do TFDP do MAE na zona 2A, realizada na consulta de diagnóstico.....	84
Figura 5: (a) e (b) Recolha de tecido adiposo .....	84
Figura 6: Material biológico recolhido – tecido adiposo .....	85
Figura 7: Material biológico recolhido – 200 ml de sangue periférico .....	85
Figura 8: Imagem ecográfica transversal do TFDP do MAE na zona 2A – 1º controlo realizado 7 dias após aplicação da terapia. ....	86
Figura 9: Imagem ecográfica longitudinal do TFDP na zona 2A – 1º controlo realizado 7 dias após aplicação da terapia. ....	86
Figura 10: Imagem ecográfica transversal do TFDP na zona 2A – 2º controlo realizado 22 dias após a aplicação da terapia.....	87
Figura 11: Imagem ecográfica transversal do TFDP na zona 2A – 2º controlo realizado 22 dias após a aplicação da terapia.....	87
Figura 12: Imagens radiográficas – (a) Projeção DP 45º da extremidade distal do MAD; (b) Projeção caudo-cranial; (c) Projeção LM da articulação FTP.....	88
Figura 13: Imagens de R.M da extremidade distal do MAD .....	89
Figura 14: Imagens de R.M da extremidade distal do MAD (continuação).....	90
Figura 15: Tubos enviados pela <i>FAT STEM</i> contendo células estaminais .....	90

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1: Número de semanas em cada serviço do Hospital Veterinário da <i>U. Gent.</i> .....	1
Tabela 2: Frequência absoluta e relativa de casos clínicos observados no <i>Hippiatrica</i> .....	4

## Índice de Anexos

Anexo I: Representação gráfica da relação *stress*/estiramento de um tendão (adaptado de [pages.uoregon.edu](http://pages.uoregon.edu))

Anexo II: Diretrizes do sistema de graduação da claudicação em cavalos (AAEP) (adaptado de [www.aaep.org](http://www.aaep.org))

Anexo III: Procedimento para recolha de tecido adiposo: Protocolo do *Hippiatrica – Equine Medical Center*

Anexo IV: Protocolo e instruções para recolha, acondicionamento e envio de amostras para o laboratório da *FAT STEM* (referente ao kit para lesões de tendões e ligamentos)

Anexo V: Formato geral do Plano de Reabilitação utilizado no *Hippiatrica – Equine Medical Center*

Anexo VI: Relatório de R.M do caso clínico nº2

Anexo VII: Protocolo e instruções para recolha, acondicionamento e envio de amostras para o laboratório da *FAT STEM* (referente ao kit para lesões articulares)

Anexo VIII: Kits comerciais disponibilizados pela *FAT STEM* para o acondicionamento e envio de amostras para laboratório (A) Kit para aplicação em lesões de tendões e ligamentos (B) Kit para aplicação em lesões articulares

## Índice de Abreviaturas

AAEP: *American Association of Equine Practitioners*

AAT: Enzima Aspartato Aminotransferase

AINEs: Anti-inflamatórios Não Esteroides

ALP: Enzima Fosfatase Alcalina (*Alkaline Phosphatase*)

ASCs: Células Estaminais Adultas ou Somáticas (*Adult Stem Cells*)

BID: Duas vezes ao dia

BMP-2: *Bone Morphogenetic Protein 2*

BWP: *Belgisch Warmbloed Paard (Belgian Warmblood)*

COMP: *Cartilage Oligomeric Matrix Protein*

COX-1: Cicloxigenase-1

COX-2: Cicloxigenase-2

DMSO: Dimetilsufóxido

DPa: Projeção Dorso-Palmar

DPta: Projeção Dorso-Plantar

DPr-PaDiO: Projeção Dorsoproximal-Palmarodistal Oblíqua

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESCs: Células Estaminais Embrionárias (*Embryonic Stem Cells*)

FGF2: Fator de Crescimento de Fibroblastos 2 (*Fibroblast Growth Fator 2*)

FT: Articulação femorotibial

FTP: Articulação femorotíbiopatelar (*stifle*)

GAGs: Glicosaminoglicanos

HSCs: Células Estaminais Hematopoiéticas (*Hematopietic Stem Cells*)

IFD: Articulação interfalângica distal

IFN- $\gamma$ : Interferão gamma (*Interferon-gamma*)

IGF-1: *Insuline-like Growth Fator 1*

IL -1: Interleucina-1

IL-6: Interleucina-6

IL-10: Interleucina-10

IM: Via de administração intramuscular

IPSCs: Células Estaminais de Pluripotência Induzida (*Induced Pluripotent Stem Cells*)

IRAP: Terapia com proteína antagonista do recetor da interleucina-1 (*Interleukin-1 Recetor Antagonist Protein Therapy*)

IV: Via de administração endovenosa

LDH: Enzima Desidrogenase láctica (*Lactate Dehydrogenase*)

LM: Projeção latero-medial  
MAD: Membro anterior direito  
MAE: Membro anterior esquerdo  
MHC-I: Complexo Major de Histocompatibilidade Classe I (*Major Histocompatibility Complex Class I*)  
MHC-II: Complexo Major de histocompatibilidade Classe II (*Major Histocompatibility Complex Class II*)  
MPD: Membro posterior direito  
MSCs: Células Estaminais Mesenquimatosas (*Mesenchymal Stem Cells*)  
NK cell: *Natural Killer Cell*  
NO: Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)  
OCD: Osteocondrite Dissecante  
PaPr-PaDiO: Projeção palmaroproximal-palmarodistal Oblíqua  
PBS: *Phosphate buffered saline*  
PGA: Ácido poliglicólico  
PGE2: Prostaglandina E2  
PO: Via de administração *per os*  
PRP: Plasma enriquecido com plaquetas (*Platelet rich-plasma*)  
PSGAG: Glicosaminoglicano Polisulfurado  
R.M: Ressonância Magnética  
SID: Uma vez ao dia  
T.A.C: Tomografia Axial Computorizada  
TFDP: Tendão do Flexor Digital Profundo  
TFDS: Tendão do Flexor Digital Superficial  
TGF- $\beta$ : *Transforming Growth Fator beta*  
TGF- $\beta$ 1: *Transforming Growth Fator beta 1*  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral-alfa (*Tumor Necrosis Fator-alfa*)  
URU: Articulação úmeroradioulnar (articulação do cotovelo)  
WJ: *Wharton's Jelly*

## Índice de Símbolos

°C: graus Celsius

cm: centímetro

g: grama

g/dl: grama por decilitro

MHz: megahertz

ml: mililitro

mm<sup>3</sup>: metros cúbicos

mm Hg: milímetros de Mercúrio

UI: Unidades Internacionais

µg/kg: micrograma por quilograma

µm: micrómetro

%: percentagem

## Breve descrição das atividades desenvolvidas no estágio curricular

Na base da presente dissertação de mestrado esteve o estágio curricular decorrido no período de tempo compreendido entre setembro de 2011 e junho de 2012, numa primeira fase ao abrigo do Programa de Mobilidade *Erasmus* na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de *Gent* e, numa segunda fase, no *Hippiatrica – Equine Medical Center*.

O estágio realizado na unidade de espécies pecuárias do Hospital Veterinário da Universidade de *Gent* (*U. Gent*) decorreu entre 26 de setembro e 20 de dezembro de 2011. De acordo com o programa Erasmus apresentado pela *U. Gent*, foi possível à autora contactar com os diferentes serviços prestados pela Área de Medicina Equina. Esta primeira fase do estágio obedeceu a um número de semanas obrigatórias estipuladas pela Faculdade. Para além de equinos, nesta unidade são assistidos bovinos, ovinos, caprinos, lamas e alpacas, estas duas últimas espécies fazendo parte de projetos de investigação desenvolvidos pela faculdade.

Posto isto, a autora realizou a seguinte escala de serviços:

Tabela 1: Número de semanas em cada serviço do Hospital Veterinário da *U. Gent*

Serviços hospitalares	Nº de semanas
Patologia	1
Reprodução e Obstetrícia	1
Imagiologia	2
Cirurgia	1
Hospitalização	2
Exame Ortopédico	1
Medicina Interna	4

Tratando-se de um hospital universitário, os alunos, sobretudo os estagiários da própria faculdade e aqueles que a frequentam ao abrigo de programas de mobilidade estudantil, desempenham um papel importante na maior parte das atividades. Em todos os serviços, os estagiários acompanham os casos clínicos, participando na avaliação dos pacientes, na realização de exames complementares de diagnóstico e nos diversos procedimentos/tratamentos, sempre orientados e supervisionados pelos docentes e/ou internos. Faz ainda parte do programa *Erasmus* a presença em aulas práticas juntamente com os restantes estagiários.

Nestas aulas, foi possível à autora participar em sessões de endoscopia e palpação retal (no serviço de medicina interna); assepsia e técnicas de sutura, bloqueios nervosos



diagnósticos, ressecção intestinal (no serviço de cirurgia); colheita de sêmen, vulvoplastia de *Caslick* (no serviço de reprodução e obstetrícia) e prática de raio-X e ecografia (no serviço de imagiologia)

Concretamente, no serviço de patologia, durante o horário compreendido entre as 8:00h e as 15:00h (existindo um dia de urgência até às 17h), foi possível à autora participar na realização de necropsias, sobretudo de equinos, auxiliando os alunos e estagiários presentes. No serviço de reprodução e obstetrícia a autora participou na realização de exames físicos dos animais hospitalizados (frequência cardíaca, frequência respiratória, avaliação de mucosas, motilidade intestinal e temperatura), na ronda diária com os alunos e com o responsável pelo serviço, na recolha de sêmen de garanhões, na vigilância dos animais gestantes (sobretudo bovinos dada a época do ano), numa cesariana e no cuidado dos animais recém-nascidos (vitelos). Neste serviço foi ainda possível efetuar uma saída de campo em que se assistiu a uma cirurgia de *Caslick*. Durante as duas semanas no serviço de imagiologia a autora participou na realização e interpretação de exames complementares de diagnóstico como raio-X e ecografia não só dos animais presentes à consulta (patologias respiratórias e sobretudo do aparelho locomotor), mas também dos garanhões propostos à entrada no livro da raça BWP. Relativamente ao serviço de cirurgia, a autora teve possibilidade de participar na preparação da sala de cirurgia e na assepsia do paciente, de assistir à indução e monitorização anestésica dos pacientes, bem como de assistir ou participar como ajudante ou circulante a diferentes cirurgias, tanto de tecidos moles como ortopédicas.

No serviço de hospitalização, foi possível acompanhar as avaliações dos animais internados, bem como os seus tratamentos, tendo sido frequente a observação da realização de pensos por parte dos internos. Uma das semanas de permanência neste serviço foi em turno da noite e fim de semana, realizando a medicação mais tardia, vigilância dos animais internados e cirurgias de urgência, tendo tido a oportunidade de assistir a duas laparotomias exploratórias. Quanto ao serviço de exames ortopédicos, a autora teve a possibilidade de observar a realização de exames de claudicação, bloqueios nervosos, tratamentos articulares e ferração. Por fim, no serviço de medicina interna, que anualmente apresenta uma média de 2000 casos (71% de equinos, 25% de bovinos e 5% de outras espécies como caprinos e ovinos) (<http://www.laim.ugent.be>) a autora participou na receção e avaliação de novos pacientes, na realização de exames complementares de diagnóstico e nos tratamentos, sendo exigido aos estagiários que, ao longo do dia, fossem atualizando as fichas clínicas no que dizia respeito a medicação, caminhar e alimentação dos animais. Era ainda função dos estagiários ajudar os alunos de anos anteriores na realização dos exames físicos, na administração de medicação e na ronda dos estábulos, sempre sobre supervisão de internos. Neste serviço, estava ainda estipulada uma semana de turno da noite, na qual a autora fez parte da escala de rondas de 2h em 2h pelos estábulos para vigilância,

medicação e fluidoterapia dos animais internados. No final de cada semana, os estagiários, divididos por grupos, expunham, perante o responsável do serviço e restantes colegas, os casos clínicos mais relevantes dessa semana, dando oportunidade à discussão e esclarecimento de dúvidas. Foram apresentados dois casos clínicos pelo grupo do qual fazia parte a autora, subordinados aos temas: “Leptospirose” e “Cavalo em permanente decúbito”. Para terminar a descrição desta primeira fase do estágio, foi possível à autora frequentar algumas aulas teóricas dadas em Inglês relativas a parasitologia, nutrição e endoscopia de equinos.

No período de tempo decorrido entre 2 de janeiro e 30 de junho, o estágio teve lugar no *Hippiatrica – Equine Medical Center*. Neste são prestados diversos serviços veterinários, relativos, exclusivamente, à medicina equina, sobretudo, desportiva. Nesta segunda fase do estágio, a autora teve oportunidade de contactar com uma realidade mais próxima do quotidiano de um médico veterinário de equinos em Portugal, uma vez que na fase anterior se tratava de um hospital universitário, de referência e num país muito distinto, quer em cultura (principalmente em relação ao cavalo) quer, fundamentalmente, às possibilidades financeiras.

Esta segunda fase do estágio compreendeu, aproximadamente, 720 horas, distribuídas por um horário das 8:00/9:00h-12:00h e das 14:00-18:00h (com número de urgências disponível 24h). Durante este período de tempo foram desenvolvidas diversas atividades que envolviam: monitorização diária (exame físico completo), nutrição, cuidados higiénicos e tratamento/procedimentos de pacientes internados, participação na avaliação, diagnóstico e tratamento de novos pacientes. Desta forma, foi possível desenvolver competências relativamente à nutrição de equinos, realização de pensos, administração de medicação oral (PO), intramuscular (IM), subcutânea (SC) e endovenosa (IV), lavagens pleurais e bloqueios nervosos. A participação na realização de diferentes exames complementares de diagnóstico disponíveis na clínica, nomeadamente: análises hematológicas (hematócrito, proteínas totais), radiologia digital, ecografia e endoscopia permitiram adquirir competências e maior autonomia a respeito da utilização das constantes radiológicas, do posicionamento, de parâmetros ecográficos e da interpretação de resultados. Os exames radiológicos e ecográficos incidiram, sobretudo, no diagnóstico ortopédico/traumatológico (principalmente a nível dos membros) e pneumológico.

Ainda a nível de trabalho na clínica, houve a oportunidade de participar na preparação da sala de cirurgia, na preparação pré-cirúrgica do paciente, de assistir como circulante, ajudante de cirurgião, instrumentista ou ajudante de anestesia em diferentes cirurgias, quer de tecidos moles quer ortopédicas.

Outra componente do estágio no *Hippiatrica – Equine Medical Center* foi o acompanhamento dos clínicos nos serviços de ambulatório. Nestas ocasiões, foi possível

participar em procedimentos mais rotineiros como vacinações e desparasitações dos animais mas também tratamentos dentários, exames do aparelho locomotor, pequenas intervenções (extração cirúrgica de nódulo cutâneo) e urgências, tendo tido sempre a oportunidade de observar a interação entre proprietário e médico veterinário.

Em seguida, é apresentada uma tabela onde são indicadas as frequências, absoluta e relativa, de casos clínicos observados pela autora no *Hippiatrica*, de acordo com os diferentes aparelhos.

Tabela 2: Frequência absoluta e relativa de casos clínicos observados no *Hippiatrica*

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Aparelho musculoesquelético	<b>20</b>	<b>45%</b>
Sistema gastrointestinal	<b>6</b>	<b>13%</b>
Aparelho respiratório	<b>3</b>	<b>7%</b>
Aparelho reprodutor	<b>4</b>	<b>9%</b>
Pele e anexos	<b>2</b>	<b>6%</b>
Piroplasmose	<b>1</b>	<b>2%</b>
Tratamentos dentários	<b>8</b>	<b>18%</b>
Total	<b>44</b>	<b>100%</b>

Através da análise desta tabela, é possível verificar que os casos clínicos do *Hippiatrica* – *Equine Medical Center* são, fundamentalmente, a respeito do aparelho locomotor. Isto reflete a grande vertente de medicina equina desportiva, à qual a clínica está dedicada.

## Introdução

O cavalo é, por muitos, considerado um animal de companhia e de lazer. Por muitos outros, é considerado um atleta de alta competição, sendo várias as disciplinas desportivas em que é utilizado.

Hoje em dia, as competições com utilização de cavalos são cada vez mais exigentes, não só do ponto de vista do esforço do binómio animal/cavaleiro, mas também ao nível dos montantes que nelas, normalmente, estão envolvidos. Desta forma, o papel do médico veterinário de equinos revela-se de grande importância, quer na prevenção de situações clínicas, quer na intervenção imediata aquando do surgimento destas, tendo em vista alcançar-se uma boa performance do animal, de forma a dar uma cabal resposta a proprietários cada vez mais bem informados e rigorosos.

As lesões musculoesqueléticas como fraturas, lesões articulares, problemas podais e lesões nos tendões e ligamentos, são causas comuns da retirada antecipada (Brehm et al., 2012) ou mesmo da morte de cavalos atletas. As fraturas são aquelas que conduzem à maioria dos casos fatais, frequentemente associadas a complicações tais como infeção, falha na fixação, atraso ou falha na união óssea ou laminite induzida por *stress* (Johnson et al., 1994, Riggs et al., 2002 citados por Seo et al., 2012). A perda destes animais em termos desportivos surge, sobretudo, devido à incapacidade de retomar o nível de performance anterior e ao aumento do risco de recidivas (Schauwer et al., 2010).

Com o objetivo de dar uma melhor resposta ao bem-estar animal, bem como de diminuir as perdas económicas daí decorrentes, nos últimos anos tem surgido um grande interesse pelo desenvolvimento das terapias regenerativas como a que recorre à utilização de células estaminais, de forma a ir ao encontro de uma melhor qualidade do tecido de reparação e consequente redução da lesão e da possibilidade de recidiva, o que tem sido menos eficaz mediante a utilização de tratamentos convencionais.

Na prática de medicina equina, tem sido crescente o uso destas terapias principalmente no tratamento de lesões em tendões e ligamentos e, mais recentemente, ao nível das articulações, isto porque, dependendo da disciplina e do grau de competição, geralmente os tecidos cartilágneo e tendinoso são alvo de grande *stress* e desgaste com a agravante de possuírem uma reduzida capacidade de regeneração pós-lesão (Smith et al., 2003, Koch et al., 2009, Paris & Stout, 2010 citados por Schauwer et al., 2010).

As terapias regenerativas baseiam-se em princípios biológicos que têm em conta a capacidade natural de reparação do organismo. Hoje em dia, são de diversos tipos, sendo possível recorrer, designadamente, a: PRP (plasma enriquecido com plaquetas), células estaminais (de diferentes origens) e IRAP (terapia com proteína antagonista do recetor da

interleucina-1). Qualquer uma destas terapias é muito recente e existe um reduzido número de publicações a respeito da sua utilização (Fortier et al., 2011).

Posteriormente a uma breve descrição das atividades desenvolvidas pela autora durante o estágio curricular, a presente dissertação visa apresentar um modesto estudo sobre um tipo de terapia regenerativa, mais concretamente a que passa pela utilização de células estaminais.

Pretende-se desenvolver um texto atinente a aspetos relativos às características destas células, bem como, questões relacionadas com a sua aplicabilidade em termos clínicos.

Numa primeira fase deste trabalho é feita uma breve apresentação em torno das células estaminais, dos conceitos que dizem respeito à sua origem, do isolamento e cultura das mesmas, bem como, uma breve referência aos aspetos anatómicos e fisiológicos de tendões, ligamentos e articulações, já que, em equinos, estas são as estruturas alvo da aplicação de tais terapias.

Numa segunda fase são apresentados dois casos clínicos, seguidos no *Hippiatrica – Equine Medical Center*, mediante a aplicação desta terapia regenerativa.

Ao verificar-se um crescente interesse na utilização de terapias regenerativas em medicina equina, a discussão dos referidos casos terá como objetivo debruçar-se sobre os seus resultados em termos clínicos e aspetos práticos da aplicação desta recente terapia, no quotidiano de uma clínica dedicada à medicina equina desportiva.

## **I. Revisão bibliográfica**

### **1. Células estaminais**

O conceito de terapia à base de células estaminais vem sendo utilizado há mais de uma década (Clegg & Pinchbeck, 2011). Por sua vez, o uso de células estaminais mesenquimatosas (MSCs) na medicina ortopédica equina tem registros iniciais por volta do ano de 2003 e desde essa altura tem-se verificado um significativo aumento da sua aplicação como opção de tratamento (Peroni & Borjesson, 2011).

O principal objetivo desta terapia, consiste em restaurar a arquitetura normal e função biomecânica do tecido lesionado, tirando partido do potencial terapêutico destas células na regulação da inflamação, na promoção da regeneração dos tecidos e na prevenção da formação de tecido cicatricial. Para que tal ocorra, é necessário proporcionar-se apropriadas interações espaciais e temporais entre as células estaminais, uma estrutura de suporte (matriz) e fatores de crescimento (Fortier & Smith citados por Borjesson & Peroni, 2011).

O tratamento das doenças, principalmente das doenças crónicas, é feito através do uso de fármacos que aliviam os sinais clínicos. Todavia, estes não se têm mostrado de grande eficácia na regeneração dos tecidos e consequente cura da doença. Desta forma, torna-se importante o conhecimento do desenvolvimento, manutenção e regeneração dos tecidos, quando sujeitos a doença aguda ou crónica (Gattegno-Ho et al., 2011).

Na base destes processos, estão as células estaminais e para um melhor aproveitamento das capacidades regenerativas do próprio organismo, torna-se necessário adquirir mais conhecimentos sobre este tipo de células, bem como a respeito da sua função no organismo, sobretudo durante um processo patológico (Gattegno-Ho et al., 2011).

As células estaminais possuem a capacidade de, indefinidamente, darem origem a idênticas células filhas (processo de autorrenovação através de replicação) mas também a células diferenciadas. Estas capacidades devem-se a dois tipos de divisão celular: simétrica e assimétrica, surgindo na última uma célula filha com as mesmas propriedades e potencial de divisão de uma célula estaminal e uma célula progenitora, mais limitada em termos de autorrenovação (Gattegno-Ho et al., 2011).

Nos animais existem dois grandes tipos de células estaminais: as células estaminais embrionárias (ESCs), presentes na camada interna do embrião no momento de peri-implantação (blastocisto), mais precisamente a partir do dia oito pós-ovulação nos equinos (Fortier, 2009) e que podem dar origem às três camadas germinativas – endoderme, mesoderme e ectoderme (capacidade denominada por pluripotência), bem como as células estaminais adultas ou somáticas (ASCs) as quais são responsáveis pela manutenção dos tecidos (Gattegno-Ho et al., 2011).

As ESCs, tal como as adultas, possuem a capacidade de se autorrenovarem continuamente (mantendo o estado de pluripotência) mas além disso, por estarem numa fase inicial de desenvolvimento, são consideradas privilegiadas em termos imunes, não sendo reconhecidas pelo sistema imunitário do organismo recetor (Dattena et al., 2009 citado por Gattegno-Ho et al., 2011). A pluripotência destas células tem sido demonstrada *in vitro* mas não tem sido provada *in vivo* (Paris & Stout, 2010 citado por Borjesson & Peroni, 2011). Além disso, têm-se verificado dificuldades na cultura a longo prazo das ESCs, o que se pensa ter origem na falta de informação sobre as vias de sinalização necessárias à manutenção da autorrenovação destas células. As diferenças reprodutivas como a sazonalidade, diferenças a nível de desenvolvimento embrionário ou a falta de reagentes biológicos específicos das espécies como é o caso de anticorpos, têm colocado dificuldades nos estudos que envolvem estas células, principalmente no que respeita à obtenção de amostras embrionárias (Gattegno-Ho et al., 2011). Nos equinos verifica-se, *in vivo*, um baixo número de embriões disponíveis para recolha, bem como dificuldades na produção de embriões *in vitro* (Hackett & Fortier, 2011 citados por Lacono et al. 2012).

O uso destas células também tem levantado questões éticas, particularmente no que respeita à utilização de embriões para investigação. No entanto, esta problemática mostra-se atenuada relativamente às espécies animais, ao contrário do que acontece com o uso de embriões humanos.

A presença de ASCs e de um mecanismo de controlo, tornam-se necessários para garantir a homeostasia dos organismos (Boiani & Scholer, 2005 citado por Gattegno-Ho et al., 2011). Estas células são capazes de se autorrenovar num tecido específico e por tempo indeterminado e, ainda, de manter o potencial de divisão assimétrica, dando origem a idênticas células filhas e a tipos de células específicas, dependendo das instruções (sinalização) que recebem do ambiente em que se encontram.

As ASCs estão presentes em muitos, se não todos os tecidos adultos, embora em pequenas quantidades (Stewart & Stewart, 2011), tendo sido descrita a sua presença na medula óssea, cérebro, coração ou pele. A ativação e proliferação destas células é o mecanismo mais comum de regeneração de tecidos em animais (Stocum & Zupanc, 2008 citados por Gattegno-Ho et al., 2011). Nesta regeneração, para além da capacidade de produção de matriz tecidular e da sua capacidade de multipotência, isto é, da sua capacidade de diferenciação em todo o tipo de células do sistema orgânico específico do qual derivaram, é também de grande importância a produção de proteínas bioativas por parte destas células estaminais. Exemplo destas proteínas, são os fatores de crescimento, fatores antiapoptóticos e agentes quimiotáticos que intervêm na dinâmica celular ambiente tendo efeitos anabólicos, estimulando a neovascularização e recrutando células estaminais adicionais para o local, designadamente, na lesão dos tecidos (Ribitsch et al., 2010). A estas capacidades acresce o facto de serem consideradas não-tumorigénicas, ao contrário das

ESCs, o que reforça o seu grande potencial terapêutico (Knoepfler, 2009 citado por Gattegno-Ho et al., 2011).

Existem diferentes tipos de ASCs já identificadas, havendo uma melhor caracterização da população do sistema hematopoiético (HSCs), proveniente do cordão umbilical ou da medula óssea. Nos equinos, esta população permanece mal caracterizada, não existindo presentemente a sua aplicação terapêutica nestes animais (Borjesson & Peroni, 2011).

O grupo das MSCs tem vindo a destacar-se pelo seu potencial terapêutico. Estão presentes no tecido conjuntivo (estroma), não hematopoiético da medula, sendo uma das populações que dá suporte às HSCs (Laflamme & Murry, 2005 citado por Gattegno-Ho et al., 2011; Stewart & Stewart, 2011) e apresentam a capacidade de se diferenciar em diferentes células mesenquimatosas, podendo dar origem a: tecido ósseo, cartilágneo, tendinoso, estroma da medula, tecido adiposo e a uma variedade de outros tecidos conjuntivos (Caplan & Bruder, 2001 citados por Gattegno-Ho et al., 2011). Este tipo de células existe também ao nível da derme, polpa dentária, periósteo, sinóvia, sangue do cordão umbilical e sangue periférico.

Apesar de estarem descritas diferenças em termos de morfologia, taxas de crescimento, potencial de proliferação e capacidade de diferenciação entre estas diferentes origens, as MSCs partilham muitas características, o que sugere uma ontogenia semelhante (Nixon, Watts & Schnabel, 2012). Para além da capacidade de se diferenciarem em células da linha mesenquimatosa, estas células estaminais são capazes de se transdiferenciar em células de origem endodérmica e neuroectodérmica (Ahmad et al., 2012). Este potencial foi referido como plasticidade das células estaminais (Fortier, 2005, Hoynowski et al., 2007 citados por Schauwer et al., 2010).

A facilidade no isolamento, expansão e potencial de diferenciação, juntamente com uma baixa imunogenicidade, fazem com que estas células sejam candidatas ideais para estratégias terapêuticas e de reparação de tecidos animais. Efetivamente, a última das mencionadas características e o facto de não expressarem o complexo major de histocompatibilidade classe II (MHC II) e outras moléculas coestimuladoras, justifica a ideia de não ser necessário promover a imunossupressão aquando de um transplante alogénico, pois este tipo de células são imunossupressoras tendo efeito, inclusive, sobre a proliferação de linfócitos (Klyushnenkova et al., 2005 citado por Ahmad et al., 2012).

Outro tipo de células estaminais que estão a ser desenvolvidas são as células estaminais de pluripotência induzida (IPSCs), ou seja, células somáticas, portanto diferenciadas, que foram sujeitas a uma “reprogramação” em células do tipo ESCs (Ahmad et al., 2012) (Figura nº1). Isto foi conseguido através da introdução exógena de genes característicos das células embrionárias por meio de vetores virais. Estas células são comparáveis às ESCs, exibindo um crescimento e morfologia iguais, bem como a expressão de marcadores característicos



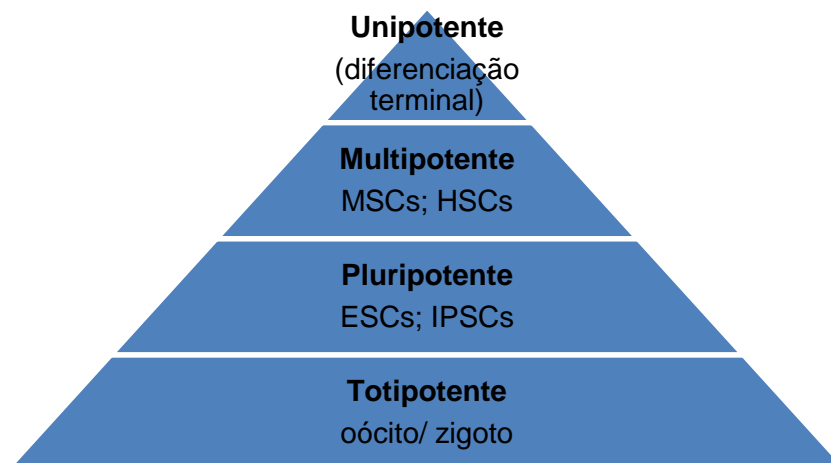


Figura 1: Ilustração hierárquica do potencial de diferenciação das células estaminais  
(Adaptado de Spencer et al., 2011)

destas células, a diferenciação *in vitro* nos três tipos de linhas germinativas e a formação de teratomas (Takahashi & Yamanaka, 2006, Zhao & Daley, 2008 citados por Gattegno-Ho et al., 2011).

As vantagens no uso destas células em relação às embrionárias são muitas, como o facto de se conseguirem ultrapassar os problemas éticos anteriormente referidos, a possibilidade de se realizar uma terapia dirigida ao indivíduo, minimizar o potencial risco de rejeição durante o tratamento (já que são autólogas), ultrapassar as dificuldades de fertilização de oócitos e posterior maturação *in vitro* ou reduzir o número de blastocistos utilizados. Contudo, estes estudos mostram-se ainda muito iniciais, verificando-se alguns problemas no que respeita à obtenção destas células, principalmente no que concerne ao uso de vetores virais e a uma excessiva manipulação *in vitro*, o que poderá levar ao surgimento de mutações e tumorigenicidade (Yu et al., 2007, Okita et al., 2007 citados por Gattegno-Ho et al., 2011; Nelson et al., 2008 citado por Lacono et al., 2012). O desenvolvimento destas células ainda não foi registado com sucesso nos equinos (Borjesson & Peroni, 2011).

Pelas razões anteriormente expostas e pelo facto de as MSCs poderem ser utilizadas na terapia do próprio animal dador, evitando assim uma reação e rejeição por parte do sistema imunitário, são alvo, nos dias de hoje, de grande interesse científico e médico, nomeadamente, médico-veterinário na área da medicina equina desportiva.

Posto isto, apresenta-se, seguidamente, uma descrição mais pormenorizada destas células.

### 1.1. Caracterização das células estaminais mesenquimatosas

As MSCs apresentam uma morfologia celular variada, surgindo células de aspeto fusiforme, delgadas e alongadas e células mais cuboides, com pequenas extensões citoplasmáticas (Stewart & Stewart, 2011).

Os critérios utilizados na identificação das MSCs incluem a sua capacidade de aderência a substratos plásticos, a grande capacidade de expansão clonal e a capacidade de diferenciação nas linhas de células mesenquimatosas (Friedenstein et al., 1968, Pittenger et al., 1999 citados por Stewart & Stewart, 2011).

A aderência a substratos plásticos não é exclusiva deste tipo de células mas permite a distinção de subpopulações celulares medulares, que estão associadas a linhas hematopoiéticas (Stewart & Stewart, 2011).

A capacidade de diferenciação em distintas linhas é um dos critérios usados na definição das MSCs (Dominici et al., 2006 citados Taylor & Clegg, 2011). Esta característica é baseada na alteração da expressão genética e metabólica que leva a uma mudança no fenótipo e no caso das MSCs equinas destinadas ao uso musculoesquelético, estas podem diferenciar-se na linha condrogénica, na linha osteogénica ou na linha adipogénica (Taylor & Clegg, 2011). Para estas determinações, foram utilizados diferentes meios de cultura, com diferentes composições que permitiram a diferenciação celular. No entanto, estas determinações dizem respeito a condições *in vitro*, não se sabendo, com certeza, qual o resultado quando transferido para uma situação clínica, *in vivo* (Park et al., 2006, De Bari et al., 2004 citados por Stewart & Stewart, 2011).

Em alguns estudos, tem-se verificado que estas células, uma vez implantadas nos tecidos, ou não permanecem no local da lesão, ou então ocorrem diferenças, designadamente ao nível da síntese e deposição de proteínas. Isto sucede, sobretudo, devido à grande complexidade dos tecidos e processos *in vivo*, o que torna difícil a sua reprodução em condições laboratoriais (Stewart & Stewart, 2011).

A capacidade de proliferação destas células é a base para o seu isolamento, através de expansão clonal *in vitro*. As células mais diferenciadas que eventualmente façam parte das amostras biológicas, não possuem esta capacidade e, ao fim de várias passagens *in vitro*, verifica-se o predomínio de células estaminais. No entanto, esta capacidade de divisão celular não é ilimitada, ao contrário das ESCs. Na realidade, *in vivo*, as MSCs encontram-se num estado próximo do quiescente (Orford & Scadden, 2008 citado por Stewart & Stewart, 2011) mas, na expansão *in vitro*, a sua proliferação aumenta, conduzindo a uma senescência replicativa. Esta senescência pode levar à perda de multipotência destas células (Javazon et al., 2004, Stolzing et al., 2006 citados por Stewart & Stewart, 2011) e ter impacto na sua eventual capacidade de se deslocarem para os locais de lesão e inflamação (Rombouts & Ploemacher, 2003 citados por Stewart & Stewart, 2011). Isto pode tornar-se

evidente, sobretudo, nos casos que exigem uma grande expansão antes da reimplantação. O surgimento e os efeitos desta senescência replicativa podem ser contrariados através da adição de um fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), ao meio de cultura celular (Tsutsumi et al., 2001, Zaragosi et al., 2006 citados por Stewart & Stewart, 2011). Condições de hipóxia também aceleram a proliferação das MSCs (Grayson et al., 2007 citados por Stewart & Stewart, 2011), bem como, a expansão em meios de cultura com níveis reduzidos de glicose, diminuindo a apoptose e aumentando a formação e tamanho destes conjuntos celulares (Stolzing et al., 2006 citados por Stewart & Stewart, 2011).

A imunofenotipagem das células estaminais, nomeadamente das células equinas, tem sido um dos objetivos de estudos mais recentes. A identificação das células estaminais por meio dos seus marcadores de superfície irá facilitar o seu rápido isolamento numa amostra composta por um misto de populações celulares (não MSCs), como por exemplo em aspirados, em fluidos corporais ou nos produtos de digestão tecidual. Esta identificação também possibilitará a uniformização dos protocolos de isolamento. Contudo, a imunofenotipagem tem-se revelado difícil, sobretudo no que diz respeito a espécies animais como a equina, devido à falta de anticorpos que reconheçam os epitopos específicos e a diferenças biológicas entre espécies (Stewart & Stewart, 2011). Diversos estudos têm utilizado anticorpos humanos para esta identificação, mas tem-se observado não existirem reações cruzadas entre diferentes espécies (Schauwer et al., 2010).

Os painéis de anticorpos usados na identificação celular são de dois tipos: de exclusão, isto é, que identificam epitopos pertencentes a populações não MSCs (exemplo CD14 presente nos monócitos) ou permitem a identificação positiva, portanto, epitopos expressos pelas células estaminais. A identificação positiva é mais difícil que a identificação negativa ou de exclusão, precisamente porque há diferenças evidentes entre espécies a respeito da expressão de marcadores de superfície e porque esta pode alterar-se durante o tempo de cultura celular (Radcliffe et al., 2009, Gronthos et al., 2003, Hackett et al., 2011 citados por Stewart & Stewart, 2011). Além disso, existem evidências de que as populações de MSCs imunofenotipicamente semelhantes mas de origens diferentes, divergem em termos de capacidades de diferenciação osteogénica, condrogénica e adipogénica (Shirasawa et al., 2006 citados por Stewart & Stewart, 2011), o que torna ainda mais complexa esta identificação.

Nas MSCs, foi registado por diversos investigadores e de forma constante, a expressão de CD29, CD44, CD90 (Stewart & Stewart, 2011; Schauwer et al., 2010) e complexo major de histocompatibilidade classe I (MHC-I), sendo negativa para CD14, CD79 $\alpha$  e MHC-II (Guest et al., 2008 citados por Schauwer et al., 2010). Outros autores vão mais longe, indicando diferenças na expressão entre células de origens distintas. Sendo assim, as células com origem na medula óssea são negativas para antigénios leucocitários CD18 e CD45 e positivos para  $\beta_1$  integrinas, fibronectina, colagénio IV, CD44, CD29 e CD90 (Arnhold et al.,

2007, Radcliffe et al., 2010 citados por Borjesson & Peroni, 2011). As células de origem adiposa expressam CD44 e CD90 (de Mattos Carvalho et al., 2009 citados por Borjesson & Peroni, 2011) enquanto as provenientes do sangue e tecido do cordão umbilical são negativas para CD18, marcador epitelial, fator *von Willebrand* e variáveis na expressão de actinas de tecido muscular liso, osteonectinas e osteocalcinas (Schuh et al., 2009, Cassade et al., 2010 citados por Borjesson & Peroni, 2011).

Ainda existe um longo trabalho no que diz respeito ao desenvolvimento de um protocolo para a imunofenotipagem e isolamento das MSCs equinas, bem como na determinação de algum imunofenótipo clinicamente superior para a realização da distinção das populações celulares (Stewart & Stewart, 2011).

## **1.2. Propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras das células estaminais**

A participação das MSCs na regeneração dos tecidos carece ainda de muito estudo, não só no que diz respeito ao seu envolvimento direto, mas também em relação às suas atividades parácrinas (Stewart & Stewart, 2011). Estas células são capazes de produzir mediadores bioativos e moléculas de aderência (diversas citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e proteínas imunomoduladoras) que inibem a apoptose, promovem a angiogénese, recrutam e estimulam as células estaminais locais a regenerarem funções, inibem a inflamação e, conseqüentemente, a formação de tecido cicatricial (Stewart & Stewart, 2011; Peroni & Borjesson, 2011).

De acordo com estudos efetuados com MSCs aplicadas em modelos de doenças, tem-se verificado que, na regeneração de tecidos, está envolvida uma interação com o sistema imunitário do hospedeiro, ou seja, resulta de uma função imunomoduladora desempenhada por estas células (Griffin et al., 2010, Singer & Caplan, 2011 citados por Peroni & Borjesson, 2011). As MSCs apresentam dois efeitos a nível do sistema imunitário, uma resposta anti-inflamatória e uma alteração a nível imunitário. Estas células regulam as respostas imunitárias, alterando a produção de anticorpos por parte dos linfócitos B, promovendo alterações em subtipos de linfócitos T e induzindo tolerância imunitária em casos de transplantes alogénicos. As MSCs apresentam ainda o potencial de transportar genes (Peroni & Borjesson, 2011).

Este tipo de células interage, então, com praticamente todas as células do sistema imunitário, como linfócitos B, linfócitos T, células *natural killer* (NK cell), células dendríticas, macrófagos/monócitos e neutrófilos (Brandau et al., 2010 citados por Peroni & Borjesson, 2011), o que sugere efeitos nas respostas imunitárias inata e adquirida. No entanto, não se sabe bem se esta atividade imunomoduladora pode ser tomada como imunossupressora

(diminuição inespecífica da atividade do sistema imunitário), ou como tolerância imunitária (supressão de respostas imunitárias aberrantes, logo, mais específicas).

A capacidade imunomoduladora das MSCs, depende de diversos fatores como: ativação, origem, dose, tempo de administração das células e contacto destas com as células do sistema imunitário. Estudos têm revelado que as MSCs não libertam proteínas imunomoduladoras sem sofrerem ativação (DelaRosa et al., 2009, Deuse et al., 2010 citados por Peroni & Borjesson, 2011), o que acontece quando presentes num ambiente inflamatório. Um ambiente de inflamação aguda, caracterizado pela presença de moléculas como interleucinas 1 e 6 (IL-1; IL-6) ou fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF –  $\alpha$ ), indo ativar de forma distinta as MSCs em relação a um ambiente de inflamação crónica ou em situações imuno-mediadas, caracterizadas pela presença de células ativadas ou interferão gamma (IFN- $\gamma$ ) (Peroni & Borjesson, 2011). Estudos mais recentes estão empenhados no conhecimento da manipulação *in vitro* destas células, antes da sua implantação, por forma a maximizar as suas propriedades biológicas e funcionais, surgindo assim o desenvolvimento de estruturas de suporte que permitem a manipulação física e espacial das células, a sua sobrevivência e integração no local de implantação ou estudos sobre a exposição das células a meios hipóxicos, com fatores de crescimento específicos ou agentes biológicos variados, testando a sua viabilidade (Rosova et al., 2008, Khan et al., 2011, Mias et al., 2008, Wang et al., 2009 citados por Peroni & Borjesson, 2011).

As MSCs de origens diferentes partilham marcadores de superfície e características de crescimento semelhantes. No entanto, apresentam diferenças entre si que levam a que células deste tipo, com origem na medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo, apresentem *in vitro* e provavelmente *in vivo*, uma ação de modulação da resposta imunitária e uma resposta a mediadores de inflamação distintas (Deuse et al., 2010, Yoo et al., 2009 citado por Peroni & Borjesson, 2011). Inclusivamente, estudos sugerem que as MSCs com origem na medula óssea e tecido adiposo, estarão mais relacionados entre si do que com aquelas provenientes de tecidos placentários (Toupadakis et al., 2010, Jansen et al., 2010 citados por Peroni & Borjesson, 2011).

Os efeitos inibitórios das MSCs são dose dependentes, estando ainda em estudo a dose ideal a aplicar em qualquer lesão de equinos. Porém, tem-se demonstrado em alguns estudos que doses elevadas de MSCs possuem uma atividade de imunossupressão enquanto que perante uma dose baixa, pode dar-se imunoestimulação (Sun et al., 2010, Najar et al., 2009 citados por Peroni & Borjesson, 2011) ou a não inibição da proliferação de linfócitos (Najar et al., 2010 citados por Peroni & Borjesson, 2011). Num estudo de um modelo canino foi indicado que uma possível dose ideal de MSCs se encontraria entre as  $10^5$  e as  $10^7$  células, já que valores abaixo do intervalo eram menos viáveis e que acima haveria maior número de células em apoptose. Num valor intermédio verificou-se a

manutenção do ambiente estrutural e das matrizes extracelulares (Serigano et al., 2010 citado por Peroni & Borjesson, 2011).

No que diz respeito ao momento de aplicação das células, a informação existente é ainda diminuta, embora alguns modelos animais suportem a ideia de que deve ocorrer após uma semana de lesão, mais propriamente num momento em que se verifique uma atenuação da resposta inflamatória aguda (Han & Kweon, 2011, Hu et al., 2007 citados por Peroni & Borjesson, 2011).

As MSCs demonstraram ter efeitos distintos em diferentes fases da lesão, isto porque as diferentes células (sobretudo linfócitos T) (Carrion et al., 2011 citado por Peroni & Borjesson, 2011) e mediadores presentes no processo inflamatório que evolui de agudo para crónico, poderão alterar a ativação das células estaminais. Quer isto dizer que a aplicação desta terapia pode ter diferentes efeitos consoante a fase do processo inflamatório (Peroni & Borjesson, 2011).

Mais concretamente, as MSCs atuam ao nível da resposta imunitária através da produção de múltiplos fatores e/ou por contacto direto com as células: linfócitos T, células NK, linfócitos B e células dendríticas (DelaRosa et al., 2009, Najar et al., 2009 citados por Peroni & Borjesson, 2011). Esta ação pode ser local mas este tipo de células pode também acumular-se ao nível de órgãos linfoides secundários (como os linfonodos drenantes) e atenuar uma resposta tipo hipersensibilidade retardada, ao induzir a apoptose de células imunitárias. Embora sejam necessários mais resultados, tem-se verificado que as MSCs de equinos, uma vez ativadas, produzem abundantemente fatores como prostaglandinas E2 (PGE2) e IL-6 e óxido nítrico (NO) e TGF- $\beta$  em quantidades variáveis, dependendo da origem e estímulo de ativação das células. Aparentemente, os fatores produzidos por estas células atuam em conjunto ou sequencialmente (Peroni & Borjesson, 2011).

Em relação aos linfócitos T, as MSCs são capazes de modelar a sua atividade através do contacto direto, célula com célula e por meio da secreção de mediadores (Najar et al., 2010, Xu et al., 2007, Ren et al., 2010 citados por Peroni & Borjesson, 2011). Como exemplo destes mediadores é possível referir: PGE2, IFN- $\gamma$  ou interleucina-10 (IL-10), entre outros. Por exemplo, as células estaminais são capazes de induzir a apoptose de linfócitos T ativados, diminuir a sua proliferação e causar a alteração do seu fenótipo (Peroni & Borjesson, 2011).

Quanto às células dendríticas, em estudos realizados com células humanas e de roedores, verificou-se que a maturação, diferenciação e atividade das primeiras podem ser modeladas pelas MSCs (Yanez et al., 2010, Nauta et al., 2006, Li et al., 2008 citados por Peroni & Borjesson, 2011). O mesmo se verificará para as MSCs equinas, no entanto, ainda não existem registos que o confirmem. A imaturidade das células dendríticas, promovida pelas células estaminais, conduz a uma tolerância imunitária ou ausência de rejeição (Peroni & Borjesson, 2011).

As MSCs (humanas e de roedores) comprometem também a sobrevivência, proliferação e maturação dos linfócitos B (Tabera et al., 2008 citado por Peroni & Borjesson, 2011) e promovem tanto a estimulação como a atenuação da produção de imunoglobulinas (Corcione et al., 2006, Rasmusson et al., 2007 citados por Peroni & Borjesson, 2011). As MSCs provocam a inibição das células NK ao causarem a alteração do seu fenótipo, a supressão da sua proliferação induzida por citocinas e ao inibirem as suas funções, isto é, ao inibirem a citólise e secreção de IFN- $\gamma$  mediada por estas células (Selmani et al., 2008, Rasmusson et al., 2007, Spaggiari et al., 2008 citados por Peroni & Borjesson, 2011).

## **2. Diferentes origens das células estaminais mesenquimatosas**

Como já foi referido anteriormente, as MSCs estão presentes em vários tecidos e fluidos corporais, num número variado mas por norma baixo (Stewart & Stewart, 2011). Em medicina veterinária, para além do número de MSCs que uma origem pode fornecer, é necessário ter em conta as dificuldades que o seu processo de recolha implica, uma vez que uma determinada origem de células estaminais que teoricamente seria melhor, pode não o ser devido a questões de praticabilidade (Ribitsch et al., 2010). Para além disso há que considerar ainda os custos envolvidos.

De um modo geral, em cada origem existe um sistema complexo, espacialmente organizado em nichos, que regula as células estaminais mantendo-as num estado indiferenciado e garantindo uma taxa de proliferação apropriada às necessidades, tanto em termos de renovação da própria origem como em células estaminais para outros tecidos. Os nichos permitem a estimulação das células estaminais através do contacto mediado por células ou através da secreção de fatores, possibilitando a manutenção das populações celulares, o controlo da atividade proliferativa e a divisão assimétrica (Stewart & Stewart, 2011).

Por norma, esses nichos estão localizados próximo da vasculatura do tecido de modo a garantir a nutrição e a facilitar a migração das células estaminais através do sistema vascular. Para além das células estaminais, estes nichos apresentam outras populações celulares, de suporte, que fornecem os sinais quer através de fatores solúveis quer por contacto célula a célula, o que permite a manutenção das funções celulares. A localização e características específicas dos nichos das MSCs não são conhecidas, no entanto, a probabilidade destes se encontrarem no microambiente perivascular é elevada (Kolf et al., 2007 citado por Stewart & Stewart, 2011). Estes nichos têm importância do ponto de vista clínico, na manutenção das reservas de células estaminais. A perda ou desregulação da atividade do nicho tem sido associada ao envelhecimento, doenças degenerativas e desenvolvimento de tumores (Jones & Wagers, 2008 citados por Stewart & Stewart, 2011).

Relativamente à espécie equina, as origens mais utilizadas para a recolha destas células são a medula óssea, o tecido adiposo e o cordão umbilical.

### **2.1. Células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula-óssea**

Trata-se de uma subpopulação de células que formam o estroma da medula óssea, de onde fazem também parte as HSCs (Stewart & Stewart, 2011). Em princípio, todos os ossos contendo medula óssea podem ser utilizados na recolha de aspirados se forem acessíveis por punção transcutânea (Taylor & Clegg, 2011). Desta forma, estas células podem ser isoladas a partir de aspirados recolhidos ao nível da tuberosidade coxal (Colleoni et al., 2009, Kopesky et al., 2010 citados por Stewart & Stewart, 2011), do esterno (Bourzac et al., 2010 citados por Stewart & Stewart, 2011), da tibia ou do úmero (Taylor & Clegg, 2011). No entanto, nos equinos o local de aspiração mais comum é o esterno. De acordo com um estudo recente, a quinta estérnebra é o local mais seguro e apropriado para se realizar a recolha de medula, uma vez que a distância dorsoventral é maior e encontra-se cranial ao ápex do coração (Kasashima et al., 2011 citados por Taylor & Clegg, 2011 e Stewart & Stewart, 2011). Desta forma, são menores os riscos de punção cardíaca iatrogénica e ocorrência de pneumopericardio não-fatal (Jacobs et al., 1983, Durando et al., 2006 citados por Taylor & Clegg, 2011). Neste estudo, foi igualmente determinado que os primeiros 5 ml de um aspirado são os mais ricos em células estaminais, sendo aconselhada a recolha de 10 a 20 ml (Stewart & Stewart, 2011).

Estes procedimentos são realizados com o animal em estação, sedado (Taylor & Clegg, 2011; Ribitsch et al., 2010), geralmente, com recurso a  $\alpha 2$ -agonista (detomidina, 10  $\mu\text{g/kg}$ ) associado ou não a um opióide (butorfanol, 20  $\mu\text{g/kg}$ ).

Embora dependente de decisão do clínico, em regra, é preparada uma área de cerca de 10x10  $\text{cm}^2$  sobre o esterno, de modo a que se possa proceder a uma ecografia para reconhecimento das estérnebras e do espaço interesternal (10 MHz de frequência). Esta região é preparada assepticamente e é realizada uma anestesia local (5ml de mepivacaina). Sobre a estérnebra é feita uma incisão através da qual é introduzida uma agulha de 12 G, de biopsia (Jamshidi). Esta atravessa 1,5 cm da cortical do osso e é introduzida até à cavidade medular. Este procedimento requer cuidado para que não se verifique uma penetração intratorácica. Numa seringa de 20 ml previamente carregada com 5000 UI de heparina é acoplada à agulha, fazendo-se a recolha de 10 a 20 ml de medula óssea. Posteriormente, esta amostra é transferida assepticamente para um tubo, antes da centrifugação por gradiente de densidade (Taylor & Clegg, 2011).

A recolha a partir da tuberosidade coxal é realizada no terço ventral da asa do ílio, aproximadamente 4 cm axial à tuberosidade coxal. Uma agulha idêntica à anterior é



introduzida com uma angulação ligeiramente caudal, em direção à articulação coxofemoral contralateral (Toupadakis et al., 2010 citados por Taylor & Clegg, 2011).

Uma vez feita a recolha de medula óssea, as MSCs podem ser facilmente separadas da fração hematopoiética através da cultura e adesão a discos plásticos (Ribitsch et al., 2010).

## **2.2. Células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo**

Nos últimos anos, estas células têm-se revelado uma alternativa interessante, principalmente devido à facilidade de recolha de tecido, maior valor inicial de células e uma grande capacidade de proliferação *in vitro* (Kern et al., 2006, Vidal et al., 2007, Colleoni et al., 2009 citados por Stewart & Stewart, 2011). Este tecido pode ser facilmente obtido num plano subcutâneo (panículo adiposo ou hipoderme) e em maiores quantidades, sendo assim menos invasivo do que a obtenção de aspirados de medula óssea e, por isso mesmo, associado a um menor risco e dor para o paciente (Koch et al., 2007, Colleoni et al., 2009 citados por Ribitsch et al., 2010). O nicho destas células estaminais estará localizado perivascularmente, tal como noutros tecidos, embora ainda não sejam conhecidas as suas características, isto porque, foi constatada a correlação entre o número de células recolhidas e a densidade vascular (da Silva Meirelles et al., 2009 citados por Stewart & Stewart, 2011). Geralmente, o tecido adiposo pode ser recolhido a partir da base da cauda, num procedimento realizado em estação, ou da região dorsal aos glúteos. Estes locais são de fácil acesso verificando-se também a ausência de grandes veias (Colleoni et al., 2009, de Mattos Carvalho, 2009, da Silva Meirelles et al., 1994, Del Blue et al., 2008 citados por Borjesson & Peroni, 2011). No primeiro local, o mais comumente utilizado, o animal é sedado, podendo-se utilizar o protocolo anterior e é feita uma anestesia local, em linha e com recurso a 10 a 20 ml de lidocaína a 10% ou equivalente. É feita uma incisão de 10 cm, linear e lateral à base da cauda, através da qual são recolhidos 9 a 10 g de tecido adiposo, colocados posteriormente num recipiente estéril. O tecido subcutâneo é suturado por meio de pontos simples e a pele, noutro plano, através de agafos. No outro local alternativo (região dorsal aos glúteos), a pele e tecidos subcutâneos são dessensibilizados através de um bloqueio em L-invertido, realizando-se uma incisão de 10 a 15 cm, paralela e a 15 cm abaxial à coluna vertebral. A amostra de tecido adiposo é recolhida, na zona dorsal à fáscia superficial dos glúteos (Taylor & Clegg, 2011).

Aparentemente, as MSCs oriundas do tecido adiposo, são potentes agentes imunomoduladores, como verificado em modelos de artrites imunomediadas (Gonzalez et al., 2010 citados por Stewart & Stewart, 2011) e de ativação linfocítica *in vitro* (Bochev et al., 2008 citados por Stewart & Stewart, 2011). Dada a facilidade de recolha de tecido adiposo, as células estaminais dele derivadas, podem vir a ser especificamente indicadas para

aplicações anti-inflamatórias e de imunossupressão, mais do que para efeitos regenerativos. Há ainda evidências de que a capacidade regenerativa destas células varia com o local de recolha (Mochizuki et al., 2006 citados por Stewart & Stewart, 2011), por exemplo, as células estaminais provenientes do tecido adiposo recolhido na região infrapatelar aparentam ser especificamente pré-programadas para a diferenciação condrogénica (Mochizuki et al., 2006, English et al., 2007 citados por Stewart & Stewart, 2011).

### **2.3. Células estaminais mesenquimatosas derivadas do cordão umbilical (sangue e Wharton's Jelly) e do líquido amniótico**

A colheita de células estaminais a partir do sangue do cordão umbilical e da matriz rica em colagénio que o envolve (Wharton's Jelly), é particularmente interessante para aplicações clínicas em cavalos (Stewart & Stewart, 2011; Lacono et al., 2012). Este tecido conjuntivo do cordão umbilical é formado por células do estroma tipo miofibroblastos, fibras de colagénio e proteoglicanos (Hoynowski et al., 2007, Passeri et al., 2009 citados por Ribitsch et al., 2010). A técnica de recolha destes tecidos é não invasiva, direta e permite obter células de um tecido muito jovem (Stewart & Stewart, 2011). No caso da matriz do cordão umbilical, para obter as células estaminais nele presentes é necessário que ocorra digestão por meio de collagenase (Passeri et al., 2009 citados por Ribitsch et al., 2010).

Devido ao facto destes animais serem normalmente vigiados durante a gestação e parto, a recolha do cordão umbilical é viável e acessível, não constituindo riscos de maior quer para a fêmea, quer para o poldro recém-nascido. Contudo, o processo poderá complicar-se devido à contaminação bacteriana e/ou por leveduras com origem no canal de parto, períneo da égua e ambiente (Stewart & Stewart, 2011; Lacono et al., 2012). Esta contaminação pode afetar sobretudo a cultura e propagação celulares (Lacono et al., 2012), o que implicará o uso de meios de cultura contendo antibióticos em concentrações elevadas, quer durante a investigação, quer depois para aplicações clínicas (Ribitsch et al., 2010).

Em estudo observado, foi registada uma maior contaminação das amostras de WJ, seguidas das amostras de líquido amniótico e, por fim, do sangue de cordão umbilical (Lacono et al., 2012). A utilização de MSCs com esta origem, permitirá a formação de um banco de células estaminais, antecipando um eventual uso no futuro (Stewart & Stewart, 2011).

O primeiro método de recolha de sangue do cordão umbilical era feito através da punção da veia umbilical, proximal à rutura espontânea do cordão. Mais recentemente foi descrito um protocolo de colheita de sangue e tecido do cordão umbilical de equinos no qual o cordão é preparado assepticamente com clorhexidina seguida de álcool isopropil e é colocado um garrote 6 a 8 cm do umbigo do poldro recém-nascido. A amostra de sangue é colhida para um saco ou seringa próprios, contendo um anticoagulante (citrato dextrose). Posteriormente, o sangue é mantido a 4°C, de modo a minimizar a contaminação bacteriana e transportado

para o laboratório. O tecido do cordão umbilical é recolhido colocando-se um segundo garrote a 10 cm do primeiro. A porção de cordão umbilical entre os dois garrotes é posteriormente lavada com água tépida e submergida em 0,05% clorhexidina, penicilina/estreptomicina ou anfotericina (Bartholomew et al., 2009, Toupadakis et al., 2010 citados por Taylor & Clegg, 2011).

#### **2.4. Células estaminais mesenquimatosas presentes no sangue periférico**

Recentemente diversos estudos têm identificado pequenas concentrações de MSCs em amostras sanguíneas de animais de laboratório (Kuznetsov et al., 2001, Kuznetsov et al., 2007 citados por Stewart & Stewart, 2011). Estas células demonstraram capacidade de diferenciação numa grande variedade de tipos celulares incluindo neurónios (Marfe et al., 2011, Spaas et al., 2011 citados por Marfe et al., 2012), tendo sido isoladas em cerca de 30%-60% de equinos, células precursoras de fibroblastos (Giovannini et al., 2008, Koerner et al., 2006 citados por Stewart & Stewart, 2011). No entanto, não foi determinado se estas células derivam de células mobilizadas a partir da medula óssea ou outro local, ou se representam uma pequena população intravascular (Stewart & Stewart, 2011). Experimentalmente, estas células são capazes de repovoar espontaneamente diferentes órgãos como músculo, osso, fígado ou coração e originar células diferenciadas em resposta a uma agressão aguda ou crónica, o que leva a pensar que estas células estaminais podem contribuir para a regeneração tecidual.

A partir do sangue periférico recolhido, as células estaminais nele presentes são isoladas e, posteriormente, injetadas intravenosa e localmente na região da lesão (Marfe et al., 2012). A possibilidade de extração de células estaminais diretamente do sangue periférico e de ser possível a sua concentração para a aplicação imediata, torna esta origem muito atrativa. Todavia, ainda não foi desenvolvida uma técnica eficiente para fazer a separação e concentração das células a partir do sangue total (Stewart & Stewart, 2011).

#### **2.5. Células estaminais mesenquimatosas derivadas de tendões**

O nicho deste tipo de células estaminais localiza-se no interior dos espaços entre fibrilhas de tendões maduros (Stewart & Stewart, 2011; Ahmad et al., 2012). O seu isolamento resulta da digestão do tecido, por meio de collagenases e posterior adesão e proliferação em cultura. Estas células são multipotentes (Bi et al., 2007, Rui et al., 2010 citados por Stewart & Stewart, 2011; Ahmad et al., 2012) e apresentam particular afinidade para a matriz acelular do tendão (Stewart et al., 2009 citados por Stewart & Stewart, 2011; Alves et al., 2011). Este tipo de células demonstrou ter capacidade de diferenciação em células musculares ou adiposas (Lui & Chan, 2011 citados por Ahmad et al., 2012).

Em estudos de diferenciação *in vivo*, as MSCs com esta origem, regeneram espontaneamente estruturas do tipo tendinoso (Bi et al., 2007, Salingcarnboriboon et al., 2003 citados por Stewart & Stewart, 2011), o que torna possível o seu uso na reparação ou regeneração de tendões lesionados, sobretudo porque, tratando-se de células residentes do tendão, são aplicadas no seu ambiente, aumentando as possibilidades de sobrevivência, sendo fenotipicamente e biosinteticamente mais apropriadas (Ahmad et al., 2012; Alves et al., 2011).

Alguns estudos demonstraram interesse no ligamento periodontal como fonte de células estaminais mesenquimatosas. Com efeito, sobre condições fisiológicas, este ligamento demonstrou ter resistência a grandes forças biomecânicas, assemelhando-se a um tendão, bem como uma grande capacidade regenerativa (Ribitsch et al., 2010).

Situado entre o dente e o osso mandibular, faz parte do complexo que mantém o dente na cavidade alveolar. Dado que os dentes dos equinos apresentam crescimento contínuo, é de calcular que este tecido apresenta um turnover celular e um índice de proliferação maiores que noutros tecidos conjuntivos. As células periodontais têm ainda a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, fibroblastos produtores de colagénio e cimentoblastos. Aparentemente, o uso deste tecido, como origem de MSCs, é promissor. Contudo, o número de células que é possível extraír-se é reduzido, podendo tornar inviável a sua utilização em terapias regenerativas (Staszuk et al., 2009, Gould, 1983 citados por Ribitsch et al., 2010).

## **2.6. Células estaminais mesenquimatosas sinoviais**

As MSCs sinoviais podem ser isoladas a partir da membrana sinovial ou do líquido sinovial, embora os valores iniciais de células estaminais presentes neste último sejam muito baixos. Estas células já foram isoladas em várias espécies e um grande número de estudos tem sido efetuado com amostras de humanos dada a maior facilidade em as obter (Stewart & Stewart, 2011). Pensa-se que estas células estejam presentes na fina membrana sinovial. Aquelas que se encontram no líquido sinovial poderão ser provenientes da membrana sinovial, chegando a ele através da circulação sistémica ou provindo da população de células estaminais residentes no interior da cartilagem articular (Dowthwaite et al., 2003, Alsalameh et al., 2004 citados por Stewart & Stewart, 2011). Estas células são capazes de uma considerável proliferação e apresentam potencial de diferenciação em multilinhagens (Stewart & Stewart, 2011). Em estudos efetuados com células equinas, verificou-se o crescimento de células progenitoras de condrócitos a partir de aspirados de líquido sinovial e a partir da membrana sinovial. Estas células exibem uma proliferação rápida e persistente. Quando expandidas em culturas, apresentam diferenciação condrogénica e são influenciadas por fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ 1 e o BMP-2 (Stewart & Stewart, 2011).

Muito importante é o facto destas células não expressarem marcadores do fenótipo de hipertrofia condrócica (Chen et al., 2009 citados por Stewart & Stewart, 2011), demonstrando que se aproximam mais de uma cartilagem articular permanente do que àquela associada à formação óssea, por meio de ossificação endocondral.

## **2.7. Células estaminais mesenquimatosas derivadas da pele**

A possibilidade de obter este tipo de células a partir da derme já foi demonstrada em roedores. Esta origem apresenta vantagens uma vez que é de fácil acesso (atendendo à espécie) e de custos e riscos menores para o paciente e para o médico veterinário. Estas células demonstraram ser capazes de se diferenciar nas linhas neuroectodérmica e mesenquimatosas (Toma et al., 2001 citados por Ribitsch et al., 2010).

## **2.8. Concentrados de células estaminais mesenquimatosas**

O isolamento de MSCs envolve custos e requer tempo para que ocorra expansão celular. De forma a responder mais prontamente a situações de lesão, sobretudo lesões agudas, foram desenvolvidos concentrados de aspirados de medula óssea, de sangue de cordão umbilical, frações de estroma de tecido adiposo e PRP (Borjesson & Peroni, 2011). Estas populações de células heterogénias têm como primordial vantagem estarem disponíveis para aplicação clínica pouco tempo depois da sua recolha (Kasten et al., 2008 citados por Stewart & Stewart, 2011), normalmente após centrifugação ou digestão tecidular. Isto permite evitar as duas a três semanas de cultura celular, estando, por exemplo, a fração de estroma de tecido adiposo disponível 48h após a recolha da amostra (Fortier & Smith, 2008; Borjesson & Peroni, 2011).

Estes produtos, para além de possuírem uma estrutura de suporte e fatores de crescimento (Gutierrez-Nibeyro, 2011), contêm uma variedade de células progenitoras endoteliais (com presumíveis propriedades hematopoiéticas e angiopoiéticas), monócitos/macrófagos, MSCs, HSCs e plaquetas que poderão ter vantagens imunomoduladoras e potencial estimulador de angiogenese (Riordan et al., 2009 citados por Borjesson & Peroni, 2011; Ahmad et al. 2012). A maior desvantagem destes concentrados reside no pequeno número de MSCs que contém. Tais produtos têm sido aplicados em vários estudos, mormente naqueles que envolvem a aplicação em equinos, como em casos de tendinites, em que se verificaram melhorias na recuperação dos tecidos, principalmente na orientação das fibras do tendão e na redução dos sinais de inflamação (Nixon et al., 2008 citado por Stewart & Stewart, 2011) ou em casos de osteoartrites (Vet-Stem inc. 2011 citado por Stewart & Stewart, 2011).

Existem ainda outros tecidos que têm sido estudados como fontes de MSCs o tecido muscular, o cérebro ou o periósteo. O tecido muscular apresentou uma muito fraca diferenciação condrogénica. Contudo, possui um bom potencial de calcificação pós-diferenciação osteogénica e diferenciação adipogénica. O isolamento de MSCs a partir do cérebro não é praticável enquanto o periósteo apresenta um elevado potencial osteogénico e de proliferação condrogénica, permitindo uma maior produção de matriz cartilaginosa. (Ribitsch et al., 2010).

### **3. Vantagens e inconvenientes das células estaminais mesenquimatosas em função da sua origem**

As MSCs mais utilizadas em medicina veterinária são as provenientes da medula óssea e do tecido adiposo. As técnicas usadas na sua recolha são invasivas e os protocolos descritos têm dificuldade em fornecer uma população homogénea, apesar de se trabalhar para minimizar este fator (Marfe et al., 2012).

O processo de recolha de medula óssea é doloroso e apresenta riscos de hemorragia e infeção local, bem como de desenvolvimento de sepsis. Além disso, coloca em risco a segurança do médico veterinário que a realiza uma vez que, no caso de a colheita ser feita na tuberosidade coxal, o médico veterinário está posicionado próximo do membro posterior do animal enquanto na colheita ao nível do esterno, coloca-se ajoelhado por de baixo do animal sedado (Giovannini et al., 2008 citado por Ribitsch et al., 2010).

Em estudos com a utilização de animais de meia-idade, onde foram comparados estes dois locais de colheita de medula óssea, verificou-se que o número de células mononucleadas, MSCs e contagem celular por ml de medula óssea foram inferiores ao nível da tuberosidade coxal. Contudo e embora a variação seja grande, o que pode refletir variações na técnica de recolha ou variações individuais, a tuberosidade coxal pode ser utilizada tendo em conta o maior volume de aspirado de medula óssea que permite recolher. No entanto, o esterno permanece o local preferencial e como resultado deste estudo, verificou-se que a qualidade da sua recolha pode ser melhorada ao realizarem-se várias punções com recolha de amostras de menor volume, da mesma estérnebra ou de diferentes estérnebras (quarta e quinta). Desta forma, a diferença em termos de número de células estaminais de uma primeira para uma segunda punção, é diminuída. Além disso, foi também constatado que na punção da tuberosidade coxal, a técnica que consiste na introdução perpendicular e profunda da agulha, associada a uma pressão negativa considerável (usando, por exemplo, uma seringa de 30 ml ou 50 ml), melhora a obtenção destas amostras (Delling et al., 2012).

Geralmente e de acordo com Taylor & Clegg, 2011, a medula óssea apresenta uma reduzida densidade de células estaminais (0,01%-0,001%). Os aspirados desta apresentam

ainda o inconveniente de, em regra, as células estaminais neles presentes se encontrarem diluídas em grande volume de sangue (10 a 100 MSCs por  $1 \times 10^5$  células da medula óssea de equinos jovens) (Vidal et al., 2006 citado por Borjesson & Peroni, 2011). Daí que seja necessário a expansão celular duas a três semanas (Bourzac et al., 2010 citado por Gutierrez-Nibeyro, 2011). Esta situação é mais evidente consoante o envelhecimento do animal (Borjesson & Peroni, 2011).

A cultura celular permite aumentar o número de MSCs mas, em contrapartida, para além de mais dispendioso retarda o tratamento (Marfe et al., 2012). Daí que, muitas vezes, se verifique o recurso a concentrados, nomeadamente de medula óssea, que, embora diminuam o tempo em termos de aplicação da terapia, apresentam um baixo número de MSCs no seio de uma população celular heterogénea (Fortier et al., 2010 citado por Gutierrez-Nibeyro, 2011). Há, contudo, quem defenda que a utilização de concentrados apresenta idênticos resultados na melhoria dos tecidos cartilágneo, tendinoso e ósseo (Gutierrez-Nibeyro, 2011), quando comparados com a aplicação de produtos resultantes de cultura (Crovace et al., 2010 citado por Gutierrez-Nibeyro, 2011).

A taxa e persistência da proliferação, aparentemente, variam com a origem (Kern et al., 2006, Shirasawa et al., 2006, Vidal et al., 2007 citados por Stewart & Stewart, 2011) e com o local anatómico num mesmo tecido (Mochizuki et al., 2006 citado por Stewart & Stewart, 2011). Relativamente às células estaminais com origem na medula óssea, alguns estudos determinaram que a taxa de proliferação, em roedores e humanos, é menor do que a de outras MSCs com outras origens (Kern et al., 2006, Vidal et al., 2007, Colleoni et al., 2009 citados por Stewart & Stewart, 2011). A título de exemplo, o número de colónias primárias por célula nucleada nos tecidos sinovial, perióstio, adiposo e muscular é superior relativamente à medula óssea (Ribitsch et al., 2010). Um outro estudo permitiu, ainda, verificar que as células estaminais com origem na medula óssea atingem a senescência mais rapidamente do que as obtidas a partir do tecido adiposo ou do cordão umbilical (Vidal et al., 2011 citados por Taylor & Clegg, 2011).

O tecido adiposo tem benefícios como concentrado de populações de células nucleadas, muitos dos quais podem ser clinicamente relevantes comparativamente com a medula óssea. No entanto, não se sabe bem qual a sua eficácia quando comparada com a da cultura celular (Marfe et al., 2012).

As últimas evidências em mais do que uma espécie, incluindo a espécie equina, é de que as células derivadas deste tecido têm, biosinteticamente, uma menor capacidade de dar origem aos tecidos ósseo e cartilágneo comparativamente com as células derivadas da medula óssea e outras MSCs (Reich et al., 2009, Yoshimura et al., 2007, Koga et al., 2008 citados por Ribitsch et al., 2010; Kisiday et al., 2008, Vidal et al., 2007, Vidal et al., 2008 citados por Taylor & Clegg, 2011). De acordo com os estudos, isto pode estar associado a uma

alteração da expressão das células estaminais derivadas do tecido adiposo de proteínas da família das BMP e de recetores do fator de crescimento TGF- $\beta$  (Ribitsch et al., 2010).

Quanto à sua capacidade de proliferação, as MSCs com origem no tecido adiposo demonstraram ser superiores às células da medula óssea (Dahlgreen, 2009 citado por Ribitsch et al., 2010; de Mattos Carvalho, 2009 citado por Borjesson & Peroni, 2011), o que constitui uma vantagem sobretudo se se considerarem bancos de tecidos. Por outro lado, estas células demonstraram uma capacidade de diferenciação condrogénica inferior às células estaminais de origem medular (Vidal et al., 2008, Riekstina et al., 2009 citados por Borjesson & Peroni, 2011).

A terapia celular que recorre a células estaminais com origem no sangue periférico é um método não invasivo, com características celulares superiores comparativamente a outras células estaminais a respeito de tolerância imunitária, potencial proliferativo e potencial de diferenciação (Marfe et al., 2012), embora alguns estudos defendam que este último é mais limitado e lento do que aquele exibido por células derivadas da medula óssea, apontando para uma origem diferente (Koerner et al., 2006, Giovannini et al., 2008 citados por Ribitsch et al., 2010).

A presença de células estaminais na corrente sanguínea periférica representa uma abordagem potencialmente eficaz para a obtenção de grandes quantidades de células estaminais, capazes de se localizar em tecidos lesionados (Marfe et al., 2012), sendo, aparentemente, mais segura e menos dolorosa para o animal (Ribitsch et al., 2010). No entanto, estudos demonstraram que estas células apresentam-se mais sensíveis à ação da tripsina, à criopreservação por azoto líquido e à descongelação, o que não favorece o seu uso em terapias regenerativas (Koerner et al., 2006 citado por Ribitsch et al., 2010).

No que diz respeito às células estaminais com origem nos tecidos do cordão umbilical, estas exibem uma maior e mais consistente taxa de proliferação do que as células estaminais derivadas da medula óssea (Borjesson & Peroni, 2011) e do tecido adiposo, o que reflete a idade do tecido de origem. Em contrapartida, a eficiência no seu isolamento e na formação de colónias é, aparentemente, inferior (Kern et al., 2006, Rebelatto et al., 2008, Troyer & Weiss, 2008 citados por Stewart & Stewart, 2011).

A capacidade de multipotência das células estaminais provenientes do cordão umbilical tem sido registada como sendo mais restrita que a das células da medula óssea e do tecido adiposo, não sendo fácil a sua diferenciação adipogénica (Kern et al., 2006, Rebelatto et al., 2008, Barachini et al., 2009 citados por Stewart & Stewart, 2011). No entanto, a importância clínica deste facto não é relevante. (Stewart & Stewart, 2011). Tal não reúne consenso já que noutro estudo, foi considerado que as células estaminais derivadas do sangue do cordão umbilical apresentam uma maior capacidade condrogénica do que as células derivadas da medula óssea (Berg et al., 2009 citado por Borjesson & Peroni, 2011). As células do sangue de cordão umbilical, por outro lado, apresentaram-se capazes de se



diferenciar em células com características mesodérmicas e endodérmicas, provando ter mais plasticidade que outras MSCs. Estas capacidades foram também registadas no caso das células estaminais da matriz de cordão umbilical (Hoynowski et al., 2007 citado por Ribitsch et al., 2010). Para além desta plasticidade, em cerca de 90% das células nucleadas presentes no sangue do cordão umbilical foi identificado o marcador proteico Oct4, característico das ESCs. Este marcador proteico e outros, igualmente presentes nas células embrionárias, foram identificados nas células da matriz do cordão umbilical (Hoynowski et al., 2007, Passeri et al., 2009 citados por Ribitsch et al., 2010), revelando proximidade, provavelmente decorrente da idade do tecido.

Num outro estudo, verificou-se que a expansão das MSCs presentes no WJ é superior quando comparada com o líquido amniótico e o sangue do cordão umbilical. Relativamente ao potencial de diferenciação, os mencionados tecidos apresentaram potencial condrogénico, osteogénico e adipogénico. No entanto, o potencial adipogénico das células do sangue de cordão umbilical foi superior às células do líquido amniótico e às células de WJ, de potencial idêntico (Lacono et al., 2012).

Ao contrário do sucedido com as MSCs derivadas do sangue periférico, não se verificaram alterações em termos de morfologia, potencial de proliferação ou capacidade de diferenciação quando estas células foram sujeitas a criopreservação, descongelamento e expansão pós-descongelamento (Hoynowski et al., 2007, Passeri et al., 2009 citados por Ribitsch et al., 2010).

Estudos realizados com MSCs derivadas de tendão de equinos indicaram que estas células colonizam matrizes tendinosas com maior eficácia que as células com origem na medula óssea e que sintetizam maiores quantidades de proteínas de matriz extracelular, após colonização (Stewart et.al, 2009 citado por Stewart & Stewart, 2011). A síntese de colagénio e de proteoglicanos foi maior e o tempo de cultura até atingirem valores clínicos relevantes foi menor do que as células com origem medular (Alves et al., 2011). *In vivo*, a sua eficácia está a ser estudada mas os primeiros resultados indicam que a administração intralesional destas células melhora a organização do tecido em reparação (Stewart & Stewart, 2011).

Relativamente às MSCs derivadas do ligamento periodontal, estas, quando comparadas com as células da medula óssea, demonstraram maior expressão de fatores de transcrição específicos de tenócitos e maior capacidade para autorregeneração (Fujii et al., 2008 citado por Ribitsch et al., 2010).

Estudos em humanos e roedores demonstraram que as MSCs sinoviais em termos de proliferação, condrogénese e adipogénese, ultrapassaram outras origens (Fan et al., 2009, Yoshimura et al., 2007 citados por Ribitsch et al., 2010). Mais concretamente, estas células são potencialmente mais condrogénicas que aquelas derivadas da medula óssea, tecido adiposo ou outro tipo de tecido (Yoshimura et al., 2007, Sakaguchi et al., 2005 citados por Stewart & Stewart, 2011), o que sugere que esta origem é particularmente importante na

regeneração/reparação de cartilagem. As MSCs com origem sinovial apresentam ainda uma maior expressão de recetores hialurónicos e de enzimas envolvidas na síntese de ácido hialurónico. No entanto, embora seja necessário apenas uma pequena porção de tecido sinovial para a extração de um número considerável de células estaminais, o processo de recolha implica a realização de uma artroscopia e, conseqüentemente, a anestesia geral do paciente e todos os riscos a ela associados, especialmente no caso de grandes animais. Trata-se assim de um procedimento dispendioso e de complicada execução, dado que para a obtenção de uma cultura celular homogénea é necessário retirar o tecido subsinovial, tornando difícil a preparação deste tecido para extração das células estaminais (Ribitsch et al., 2010).

Embora a terapia com recurso às MSCs equinas já se encontre disponível, ainda não existe consenso no que diz respeito à origem indicada para o tratamento de condições específicas musculoesqueléticas. O estudo deste tipo de células deve continuar de modo a estabelecer um protocolo uniforme para a sua caracterização, o que permitirá a implementação de controlo de qualidade e melhorar a capacidade de comparação de resultados de diferentes laboratórios (Taylor & Clegg, 2011).

#### **4. Isolamento e cultura de células estaminais mesenquimatosas**

O tamanho da amostra de tecido recolhida (medula óssea, tecido adiposo e sangue de cordão umbilical) geralmente não é indicativo do número de MSCs recuperadas (Colleoni et al., 2009, Schuh et al., 2009, da Silva Meirelles et al., 2009 citados por Borjesson & Peroni, 2011). Além disso, existe uma enorme variação individual em termos de dadores o que influencia o sucesso do seu isolamento (Borjesson & Peroni, 2011). Contudo, é de prever que este sucesso será maior quanto menor for a idade do dador, sendo ideal equinos até sete anos de idade (Colleoni et al., 2009, da Silva Meirelles et al., 2009 citados por Borjesson & Peroni, 2011).

Com exceção dos concentrados, após a recolha das amostras, estas são enviadas para laboratórios especializados que, segundo os seus protocolos, fazem o isolamento e a cultura das MSCs de diferentes origens. As técnicas usadas nesta fase do processo contribuem para o sucesso de número de células isoladas (Borjesson & Peroni, 2011). Vários métodos têm sido descritos não existindo um protocolo universal, contudo, as suas bases são as mesmas (Taylor & Clegg, 2011). Por exemplo, as técnicas de isolamento das MSCs variam mas a maioria inclui a aderência a substratos plásticos, com utilização prévia de técnicas de separação como as que recorrem a gradientes de densidade (Ficoll, Percoll, dextran e sacarose). Mais recentemente, têm sido utilizadas técnicas mais sofisticadas incluindo as de reconhecimento antígeno-anticorpo em relação a marcadores de superfície (Delorme &

Charbord, 2007 citados por Nixon et al., 2012; Bourzac et al., 2010, Arnhold et al., 2007 citados por Taylor & Clegg, 2011).

As amostras de medula óssea e de sangue de cordão umbilical devem sofrer redução de volume, remoção dos eritrócitos presentes e, se possível, concentração de células mononucleadas (Borjesson & Peroni, 2011). Existem diferentes técnicas, por exemplo, através da cultura em meios apropriados (culturas de tecidos) ou através da centrifugação seguida da suspensão do pellet num meio apropriado e posterior cultura (Bourzac et al., 2010 citado por Taylor & Clegg, 2011). Outra técnica de isolamento das MSCs consiste em sujeitar o aspirado medular a uma solução de gradiente de densidade seguida de centrifugação, de modo a obter-se uma fração de células mononucleares, a qual é posteriormente aspirada e transferida para uma cultura celular. Nos equinos, as soluções de gradiente de densidade mais comumente utilizadas nesta separação são o Ficoll (1,077 g/dl) e o Percoll (1,084 g/dl) (Taylor & Clegg, 2011).

Nos meios de cultura ocorre a expansão das células estaminais. Estes meios, geralmente, contêm soro fetal bovino (10%) que fornece proteínas necessárias ao crescimento e adesão celular, promovendo assim, a proliferação celular e diminuindo o tempo de cultura. De acordo com o que afirma Taylor & Clegg, 2011 citando, por sua vez, Mosna et al., 2010 e Toupadakis et al., 2010, ao efetuar-se a comparação de culturas com e sem a presença deste soro ou com soro autólogo de equinos, revelaram vantagens na utilização do soro fetal bovino, sobretudo, no crescimento celular.

Relativamente às amostras de tecido adiposo, estas são digeridas e em seguida centrifugadas, para que ocorra a separação entre o estroma e os adipócitos. O pellet, onde se encontram as células nucleadas incluindo as células estaminais é sujeito a cultura em meio apropriado, para expansão (Vidal et al., 2007 citado por Taylor & Clegg, 2011).

No que diz respeito ao isolamento das células estaminais com origem no cordão umbilical, a sua cultura tem sido executada com sucesso em diversos laboratórios (Toupadakis et al., 2010, Koch et al., 2007, Hoynowski et al., 2007, Koch et al., 2009 citados por Taylor & Clegg, 2011). Contudo, ainda não está descrito um método consistente de isolamento destas células (Taylor & Clegg, 2011). O cordão umbilical necessita de ser lavado, desinfetado e incubado com concentrações elevadas de antibióticos antes da digestão tecidual (Bartholomew et al., 2009 citado por Borjesson & Peroni, 2011). Para que não ocorra contaminação de culturas por células endoteliais, os vasos sanguíneos umbilicais devem ser removidos do cordão (Borjesson & Peroni, 2011).

Em condições ideais, o sangue e tecido de cordão umbilical devem ser processados e congelados para futuro uso, constituindo uma boa fonte de células multipotentes. Estes dois tecidos apresentam, assim, uma utilidade terapêutica autóloga de grande potencial para o animal (Borjesson & Peroni, 2011).

O ideal em termos de cultura é que esta permita a manutenção do fenótipo e características funcionais das MSCs semelhantes às aquelas que foram exibidas no seu nicho original, com proliferação indefinida e capacidade de diferenciação em multilinhagens (Alison et al., 2006 citado por Borjesson & Peroni, 2011). A cultura a longo prazo e a grande densidade celular são fatores que conduzem à perda de potencial de diferenciação destas células.

As condições de cultura podem ser modificadas de modo a promover o isolamento e proliferação a partir de diferentes origens ou para promover a diferenciação numa linha específica. Ainda não há dados suficientes para se determinar se existem vantagens na administração de células estaminais naïve ou no início de diferenciação numa determinada linha (Borjesson & Peroni, 2011).

As MSCs mantêm-se viáveis durante o seu armazenamento criogénico (Borjesson & Peroni, 2011; Ahmad et al., 2012). O processo de criopreservação, lento (1°C/min) e até - 80°C em meio apropriado, pode ser realizado sem que se verifiquem grandes efeitos na capacidade de diferenciação das MSCs (Bourzac et al., 2010, Colleoni et al., 2009, Haack-Sorensen et al., 2007 citados por Taylor & Clegg, 2011), proliferação ou morfologia (Borjesson & Peroni, 2001).

Outra das complicações que se pode verificar a nível laboratorial, é a possibilidade de ocorrência de contaminação bacteriana e/ou fúngica. Tal situação pode ser minimizada através da adição de antibióticos e/ou antifúngicos aos meios de cultura e condicionando a temperatura e realizando a criopreservação.

Manter uma população homogénea de MSCs é difícil durante a cultura celular. No entanto, isso pode ser conseguido com base em alguns protocolos (Taylor & Clegg, 2011), por exemplo, este tipo de células é sensível à tripsina, desse modo, para reduzir a libertação de monócitos presentes na cultura, deve-se aplicar tripsina-EDTA pré-aquecido durante não mais de cinco a sete minutos a 37°C (Mosna et al., 2010, Vidal & Lopez, 2011 citados por Taylor & Clegg, 2011). O contacto direto entre células pode conduzir à sua diferenciação espontânea pelo que, é de evitar a sobrepopulação e consequente excesso de confluência. Desta forma, as células devem ser separadas quando sempre que se verifique cerca de 80% de confluência (Taylor & Clegg, 2011).

Uma das preocupações a respeito das células estaminais tem a ver com a sua capacidade de sobrevivência fora do seu “ambiente natural”, passando por culturas tecidulares e sendo aplicadas no local a regenerar, diferente da sua origem. O local de implantação pode não ser ideal em termos de nutrição, irrigação e presença de fatores de crescimento para a sobrevivência das células estaminais (Ahmad et al., 2012).

De acordo com estudos recentes, as ESCs apresentam uma capacidade de sobrevivência e de migração para outros locais diferentes do de implantação superior às MSCs. A perda destas últimas, segundo Guest et al., 2010 citado por Ahmad et al., 2012, pode dever-se a

várias razões incluindo a senescência celular, o soro usado para preparação das células ou a sua capacidade de diferenciação no tecido a regenerar.

## **5. Viabilidade das células estaminais mesenquimatosas**

Recentes estudos, têm indicado que este tipo de células mantém a sua viabilidade e aumentam a sua taxa de proliferação quando cultivadas num ambiente de baixa tensão de oxigénio. Isto pode apoiar o uso desta terapia regenerativa em lesões de tecidos, como tendões, caracterizadas por uma degeneração hipóxica que leva à apoptose das células tendinosas, sobretudo em casos crónicos.

Outros estudos, *in vitro*, revelam que o tratamento prévio das células estaminais com componentes bioativos, por exemplo, fatores de crescimento, diminui a morte celular e promove a replicação.

Tendo por base estes estudos, o uso de PRP como meio de pré-tratamento e como meio de transporte, pode ser de grande importância. Em resumo, o pré-tratamento das células estaminais com este tipo de moléculas pode promover uma maior taxa de sobrevivência das células e melhorar a sua atuação uma vez aplicadas nos tecidos.

## **6. Generalidades sobre articulações, tendões e ligamentos**

A terapia com recurso às células estaminais é particularmente útil no tratamento de articulações e tendões, dado que faltam a estas estruturas naturais capacidades regenerativas, por exemplo apresentam uma fraca resposta por parte das células estaminais locais (Hale et al., 2012). As lesões mais comumente registadas em cavalos de desporto localizam-se precisamente ao nível destas estruturas.

Como exemplo de utilização de células estaminais podem ser mencionados os tratamentos de lesões ortopédicas primárias, agudas ou crónicas incluindo tendinopatias, lesões ligamentosas, fraturas, laminites e doenças articulares como quistos ósseos subcondrais, lesão de meniscos ou defeitos na cartilagem (Borjesson & Peroni, 2011).

A doença articular é a causa de claudicação mais prevalente nos equinos (Brommer et al., 2003, Todhunter, 1992 citados por Ribitsch et al., 2010), representando cerca de 42%-60% dos casos (Frisbie, 2005, Todhunter & Lust, 1990 citados por Raheja et al., 2011). Responsável por uma diminuição de performance (Jouglin et al., 2000, Trumble et al., 2001 citados por Ribitsch et al., 2010) provoca morbilidade e grandes perdas económicas (Jefcott et al., 1982 citado por Ribitsch et al., 2010). A tendinite é também uma importante causa de claudicação e de redução de performance devido à grande incidência, morosa recuperação e grande índice de recidiva (Barreira et al., 2011 citado por Mattos Carvalho et al., 2011).

Dependendo das diferentes disciplinas desportivas, estas apresentam exigências igualmente distintas, verificando-se uma grande prevalência de lesões ao nível dos tendões flexores superficiais e ligamentos suspensores (Clegg, 2012).

Por estas razões justifica-se uma breve referência à anatomia e fisiologia destas estruturas, bem como sobre os exames complementares de diagnóstico a aplicar e tratamentos médicos e cirúrgicos convencionais.

## **6.1 Anatomia e fisiologia das articulações**

As articulações são estruturas altamente especializadas, compostas por um conjunto de diferentes tecidos como o tecido ósseo (superfícies ósseas), a cartilagem articular e os tecidos moles peri-articulares (Ross & Dysson, 2003). A articulação deve ser vista como um todo e os objetivos terapêuticos do médico veterinário devem recair sobre os vários tecidos, sobretudo os tecidos moles que fazem o suporte da articulação como a cartilagem (Fortier, 2011).

As articulações podem ser classificadas de acordo com diferentes critérios. Uma das classificações possíveis tem por base a possibilidade de movimento das articulações. Deste modo, surgem três grupos distintos: as sinartroses (articulações imóveis), as anfiartroses (articulações com pouca capacidade de movimentação) e as diartroses (articulações móveis) (Stashak, 2002). Uma outra forma de classificar as articulações é de acordo com os tipos especializados de tecido conjuntivo que estão presentes na sua constituição. Estas duas classificações estão relacionadas, uma vez que o tipo de tecidos constituintes influenciam a capacidade de movimento, isto é, os ossos envolvidos nas articulações imóveis e pouco móveis estão ligados por meio de membranas fibrosas ou cartilagíneas (sindesmoses ou sincondroses) enquanto nas articulações móveis, os ossos, embora cobertos por cartilagem hialina, estão completamente separados ficando envoltos, inclusive no interior da cavidade articular, por uma membrana sinovial (articulações sinoviais) (Stashak, 2002).

As sinartroses são, na sua generalidade, encontradas ao nível do crânio, onde as placas ósseas se apresentam firmemente unidas umas às outras através de elementos fibrosos ou cartilagíneos. As anfiartroses são caracterizadas pela presença de discos fibrocartilagíneos achatados, que unem as superfícies articulares, como é o caso da coluna vertebral. Toda a estrutura da articulação é envolvida por uma cápsula fibrosa (Stashak, 2002).

A maior parte das articulações das extremidades dos membros são diartroses, sendo zonas de frequente afeção que, normalmente, levam ao surgimento de claudicações, o que justifica a sua grande importância na clínica de equinos (Stashak, 2002).

Este tipo de articulações apresenta duas primordiais funções: permitir o movimento e a transferência de cargas, sendo compostas por superfícies articulares ósseas cobertas por

uma cartilagem articular e por uma cápsula articular e ligamentos que asseguram o seu posicionamento (Figura nº2) (Stashak, 2002).

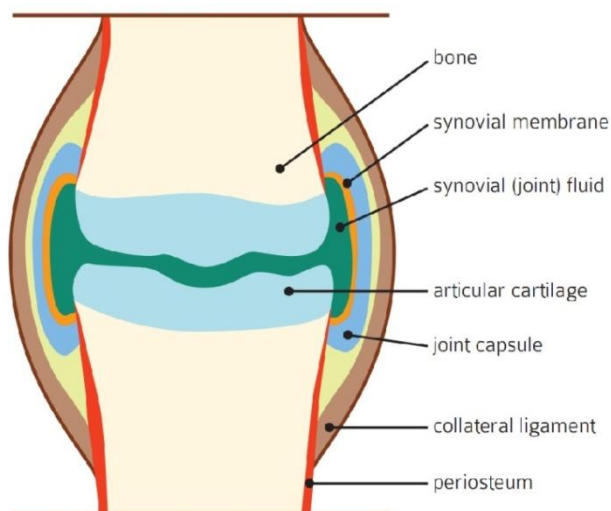


Figura 2: Representação da estrutura das diartroses

( [www.horsejournals.com/equine-joint-disease](http://www.horsejournals.com/equine-joint-disease)

Copyright© 2009-2013 Horse Community Journals Inc.)

Dependendo da articulação podem estar também presentes meniscos (discos cartilagíneos) que amortecem a articulação de ossos longos (Sellnow, 2006).

A cápsula das articulações sinoviais é constituída por duas partes: uma camada fibrosa que se localiza exteriormente, estando em continuidade com o perióstio ou pericôndrio (e em última instancia com o osso) e a membrana sinovial, que delimita a cavidade sinovial onde a cartilagem articular não está presente. Esta cavidade está preenchida pelo líquido sinovial.

A camada fibrosa, ou seja, a porção mais exterior da cápsula articular, é formada por tecido conjuntivo fibroso que fornece alguma estabilidade mecânica à articulação. Para esta estabilidade contribuem também os ligamentos colaterais, associados à cápsula articular e os ligamentos intra-articulares, normalmente cobertos pela membrana sinovial (Stashak, 2002).

Em termos histológicos, esta porção da cápsula articular e os ligamentos são constituídos principalmente por fibras de colagénio, verificando-se o predomínio do colagénio tipo I, como nos restantes tecidos fibrosos da articulação. A cápsula articular é vascular, observando-se a presença de anastomoses arteriovenosas e os terminais nervosos aferentes, nociceptores, estão localizados na membrana sinovial e camadas mais internas, bem como nos ligamentos e suas inserções. A contribuir para a estabilidade da articulação estão também a configuração óssea da articulação, as unidades musculotendíneas que a controlam e uma pressão hidrostática negativa no interior da cavidade sinovial (Stashak, 2002).

A porção interna da cápsula articular, ou seja, a membrana sinovial, geralmente apresenta-se branca a amarelo claro, lisa e brilhante ou, em locais específicos da articulação, é formada por inúmeras vilosidades de morfologia diversa. Secundariamente a traumas e/ou

outras agressões, podem surgir descolorações da membrana ou a proliferação das vilosidades sinoviais (Ross & Dysson, 2003).

A membrana sinovial não é uniforme em toda a articulação, apresentando uma maior densidade de tecido fibroso, achatado, nas zonas onde está sujeita a maiores pressões. Histologicamente, a membrana sinovial é um tecido de origem mesenquimatosa, que consiste em duas camadas, a íntima e a subíntima. A íntima constitui uma camada celular incompleta, de revestimento da cavidade articular e que está assente numa camada mais profunda de tecido conjuntivo (fibroso laxo, areolar ou adiposo), designada por camada subsinovial ou subíntima, que continua até ao centro das vilosidades e que se apresenta muito vascularizada (Ross & Dysson, 2003).

As células sinoviais (sinoviócitos), foram classificadas de acordo com um nível ultraestrutural em duas principais categorias, designadas por tipos A e B. O tipo A semelhantes a macrófagos e o tipo B semelhantes a fibroblastos, sendo ainda identificado um terceiro tipo de células intermédio, designado por alguns autores como células C (Ross & Dysson, 2003). A membrana sinovial é responsável pelo desempenho de três funções fundamentais: a fagocitose, a regulação da quantidade de proteínas e ácido hialurónico no líquido sinovial e a regeneração. As células B são as mais abundantes e têm a seu cargo a síntese de uma grande variedade de moléculas incluindo colagénio e ácido hialurónico. A capacidade fagocítica pertence aos sinoviócitos A, células que representam cerca de 10 a 20% da população celular (Ross & Dysson, 2003).

Quanto á inervação das articulações, esta é feita de duas formas, por terminações nervosas específicas, que atingem a cápsula articular como ramos independentes de nervos periféricos adjacentes e por terminações nervosas correspondentes a ramos não específicos, não articulares, provenientes de nervos musculares (Stashak, 2002).

A membrana sinovial age como uma barreira permeável que controla a composição do líquido sinovial. Na formação deste, é essencial a subíntima da membrana sinovial, muito vascularizada e que permite as trocas de nutrientes e metabolitos, tendo assim uma grande importância na homeostasia da articulação (Stashak, 2002).

A maioria das moléculas de menores dimensões atravessa a membrana mediante um processo de difusão e a maioria das proteínas presentes no líquido sinovial são provenientes do plasma. Quando ocorrem efusões traumáticas, as alterações que se verificam na composição em termos de proteínas do líquido sinovial, estão associadas ao aumento da permeabilidade vascular e ao aumento da síntese proteica pelos sinoviócitos.

A cápsula articular possui outra propriedade importante que é a sua flexibilidade, ou seja, a sua capacidade em permitir uma completa extensão de movimento. Esta propriedade pode ser afetada pela presença de inflamação e fibrose, resultando na rigidez articular. A integridade da membrana sinovial também constitui um fator importante para a capacidade de absorção de choque da articulação (Stashak, 2002).



A cartilagem articular é o principal tecido da articulação, permitindo simultaneamente a sustentação e o movimento com o mínimo de fricção entre as superfícies articulares. De uma forma geral, a cartilagem articular possui um aspeto leitoso e opaco nas regiões mais espessas, sendo translúcida e de um tom azulado nas regiões menos densas. Verifica-se ainda que esta espessura varia consoante a articulação (Ross & Dysson, 2003). A sua superfície não é lisa, observando-se depressões irregulares e ondulações. A cartilagem articular dos equinos é, de uma forma geral, do tipo hialino, sendo no entanto possível verificar-se a existência de fibrocartilagem nas articulações sinoviais, como na junção da cartilagem articular, membrana sinovial e periósteo (chamada zona de transição) e ao nível do menisco (Stashak, 2002).

Normalmente, a cartilagem articular dos animais adultos é dividida em quatro zonas, tendo os condrócitos formas diferentes no interior das mesmas: a zona tangencial ou superficial, na qual os condrócitos são alongados ou ovoides e as fibras de colagénio apresentam-se paralelas à superfície articular (tangenciais); a camada intermédia ou de transição, que contém células de maiores dimensões, arredondadas e que podem ser individuais ou estar emparelhadas e fibras de colagénio distribuídas de forma aleatória; a camada radial ou profunda, cujas células estão organizadas em colunas verticais (perpendiculares à superfície), separadas por fibrilhas de colagénio que têm uma orientação radial; e, por fim, existe uma zona calcificada, composta por cartilagem mineralizada e por condrócitos em várias fases de degeneração (Stashak, 2002).

A matriz extracelular da cartilagem articular é constituída por colagénio, proteoglicanos, glicoproteínas e água. O seu conteúdo em água varia com a idade mas o seu valor chega a atingir os 80%. O colagénio tipo II representa 90 a 95% do colagénio da cartilagem articular, dando origem a fibrilhas e fibras entrelaçadas em toda a matriz. Este é sintetizado pelos condrócitos e enquanto se verifica grande destruição e síntese de fibrilhas durante o crescimento do animal, este *turnover* é limitado nos adultos. Existem também pequenas quantidades dos colagénios tipo VI, IX, XI, XII e XIV, que intervêm na formação e na estabilidade da rede fibrillar do colagénio tipo II. As fibrilhas de colagénio permitem à cartilagem possuir uma grande resistência à tração. Nos animais adultos, esta propriedade protetora da cartilagem articular é devida, em grande parte, à orientação paralela das fibras de colagénio das camadas superficiais, relativamente à superfície da cartilagem. A resistência à tração não é tão crítica nas camadas mais profundas de uma cartilagem normal, que têm como função a ancoragem da cartilagem à placa subcondral (Ross & Dysson, 2003). No entanto, caso ocorra erosão superficial, o colagénio das camadas mais profundas encontra-se vulnerável à rutura (Stashak, 2002).

Os proteoglicanos são constituídos por um núcleo proteico e cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAGs) (unidades repetidas de dissacarídeos) e apresentam diversas formas, ocupando os espaços entre fibrilhas de colagénio. A maior parte dos proteoglicanos

formam grandes agregados designados por agreganos, sendo, portanto, esta a forma mais abundante na matriz da cartilagem articular. As cargas negativas das cadeias laterais polianiónicas de GAGs repelem-se umas às outras e apresentam grande afinidade para as moléculas de água. Estas propriedades, por sua vez, proporcionam à cartilagem articular, fortemente hidratada, a rigidez físico-química passível de ser comprimida e a capacidade de dissipar cargas, afetando também a sua permeabilidade. A interação entre os proteoglicanos e os outros constituintes da matriz, sobretudo o colagénio, é necessária para a regulação de uma variedade de processos metabólicos como, por exemplo, a inibição da fibrilhogénese do colagénio tipo II (Ross & Dysson, 2003).

As glicoproteínas, que não são colagénio ou proteoglicanos, são um grupo pequeno mas significativo da cartilagem articular. Exemplos de moléculas pertencentes a este grupo são: a condroetina, a fibronectina (que tem a função de promover a adesão das células a moléculas e superfícies), a COMP ou a ancorina. Esta última é encontrada, por exemplo, na superfície da membrana celular dos condrócitos, tendo uma grande afinidade para as fibrilhas de colagénio tipo II. Isto sugere que esta molécula pode funcionar como mecanoreceptor, fornecendo aos condrócitos a informação relativa a alterações causadas por *stress* a nível da matriz. A fibronectina é um componente em minoria na cartilagem e que contribui para a montagem da matriz, através da interação com condrócitos e elementos extracelulares (Ross & Dysson, 2003).

A cartilagem articular é avascular e não apresenta uma inervação própria, o que significa que lesões que apenas a afetem, não provocam dor (Ross & Dysson, 2003). A cartilagem articular está, assim, dependente das terminações nervosas dos ossos subcondrais e tecidos moles peri-articulares como ligamentos, cápsula articular e músculos para o fornecimento de informação propriocetiva e dor (Stashak, 2002).

Nos animais adultos, a cartilagem articular está separada dos espaços vasculares subcondrais pela placa subcondral e a sua nutrição é feita por difusão a partir do líquido sinovial. Este processo de difusão atua de acordo com um gradiente que, por sua vez, depende da espessura da cartilagem articular. Por isso, pode verificar-se necrose do tecido cartilágneo secundariamente ao aumento de espessura da cartilagem, como nos casos de osteocondrite dissecante (OCD) em que se excede os limites de difusão. A placa subcondral consiste na cortical do osso e varia de espessura dependendo da articulação em questão. Esta placa e a epífise do osso correspondente são parte integrante da estrutura da articulação, garantindo um suporte estrutural à cartilagem articular. A natureza relativamente avascular e hipóxica da cartilagem juntamente com as características não proliferativas dos condrócitos maduros, leva a que exista um prognóstico pouco favorável para a completa recuperação (Stashak, 2002).

A interação dos componentes da matriz permite que esta seja rígida à compressão, que possua uma rede de fibras capaz de suportar elevada tensão e a presença de fluído, cujo

fluxo durante a carga e a deformação ajuda à dissipação de stress dos tecidos. Estes componentes e a sua interação originam ainda uma pressão que possibilita a acumulação de água na matriz que, por sua vez, é responsável por uma pressão osmótica que pode contribuir até 50% da rigidez compressiva da cartilagem articular (Stashak, 2002).

Quando uma articulação não está sujeita à atuação de cargas, as superfícies articulares não são completamente congruentes, no entanto, durante uma carga fisiológica a cartilagem sofre uma deformação natural o que origina aumentos da área de contacto. Desta forma reduz-se o *stress* dos tecidos e é aumentada a conformidade articular, o que promove uma estabilidade adicional. Esta adaptação da forma da cartilagem articular possibilita ainda a formação e a retenção do líquido que faz a sua lubrificação. Isto acontece quando a cartilagem articular é comprimida durante a aplicação de uma carga e o fluido é redistribuído das zonas comprimidas para as zonas circundantes, mediante forças de tensão. Desta forma, verifica-se a formação de um exsudado que corresponde ao movimento do fluido intersticial da matriz, durante a deformação da cartilagem. Este exsudado assemelha-se ao líquido sinovial exceto pela sua baixa concentração em proteínas e viscosidade (Stashak, 2002).

Para que ocorra um fluxo de fluido através da cartilagem que a nutra e remova metabolitos existentes, são necessárias pressões intermitentes (ciclos de contração-relaxamento) criadas pela interação das superfícies articulares opostas, isto é, o movimento da própria articulação facilita o processo de difusão, verificando-se inclusive efeitos deletérios aquando da imobilização (Ross & Dysson, 2003).

Os nutrientes, nos animais adultos, migram dos vasos subsinoviais para o líquido sinovial (nos animais jovens é a partir de vasos subcondrais) e subsequentemente penetram na matriz da cartilagem, enquanto os metabolitos são, ao mesmo tempo, eliminados em sentido oposto (Ross & Dysson, 2003). Os proteoglicanos são os componentes com maior intervenção na difusão dos solutos ao longo da cartilagem, restringindo o movimento de moléculas de grandes dimensões não carregadas e facilitando-o para as moléculas de menores dimensões não carregadas, o que significa que as dimensões e a conformação dos solutos são fatores importantes para este processo (Stashak, 2002).

Os condrócitos são as células responsáveis pela síntese dos componentes da matriz da cartilagem, incluindo o colagénio e os proteoglicanos e uma variedade de enzimas proteolíticas que realizam a degradação de macromoléculas da matriz (Ross & Dysson, 2003). A cada etapa do crescimento, desenvolvimento e maturação, o ritmo de síntese e degradação são ajustados para atingir o crescimento, remodelação e equilíbrio. Os condrócitos e a matriz que os rodeia interagem de uma forma única, sendo estas células influenciadas por alterações na composição ou por alterações na tensão ou compressão da matriz, ou seja, o seu metabolismo é afetado por fatores intrínsecos e extrínsecos (Stashak, 2002).

As articulações sinoviais são compostas por um conjunto de tecidos que, dada a sua ação ou movimento, exigem uma lubrificação eficaz. Mais concretamente, é necessária a lubrificação durante o deslizamento da membrana sinovial sobre si, sobre outros tecidos e durante o deslizamento entre cartilagens opostas. No que diz respeito à lubrificação da membrana sinovial, o componente presente no líquido sinovial com maior responsabilidade por esta função é o ácido hialurónico. Este encontra-se na superfície da membrana sinovial, permitindo que esta deslize sobre a superfície oposta. Este processo é importante uma vez que a maior resistência surge por fricção da membrana sinovial e da cápsula articular (Stashak, 2002).

A lubrificação das cartilagens resulta de dois mecanismos, uma lubrificação chamada de barreira, que é mais ativa nas cargas mais leves e uma lubrificação hidrostática ou de exsudação, cuja função é mais importante em cargas mais elevadas. O primeiro mecanismo tem como componente principal uma fração glicoproteica de origem sinovial, as lubricinas. Estas moléculas ligam-se à superfície das cartilagens articulares e previnem o contacto direto destas superfícies quando as cargas são baixas (Ross & Dysson, 2003). Este mecanismo, sobre o efeito de cargas superiores, falha passando a ser fundamental o segundo mecanismo, ou seja, a lubrificação hidrostática. Nesta as superfícies das cartilagens mantêm-se afastadas graças a uma fina película de líquido composto por líquido sinovial e intersticial, que é exsudado da cartilagem durante a mencionada compressão. Com a libertação das forças compressivas, a cartilagem expande e este fluido é levado novamente para a matriz (Stashak, 2002). Quando ocorre inflamação no interior da articulação, esta provoca alteração nos mecanismos de lubrificação, eliminando a sua proteção e acelerando o processo de desgaste das superfícies articulares, provocando dor (Bramlage, 2011).

Na articulação, os ossos intervenientes e os tecidos moles peri-articulares permitem a absorção de grande parte do choque, desempenhando a cartilagem um papel secundário nesta função. Isto deve-se, sobretudo, à sua nutrição por difusão e à sua limitada espessura. A transmissão de forças para os tecidos circundantes através de tecidos moles peri-articulares, a incongruidade das superfícies das cartilagens e a *compliance* inerente da cartilagem e osso subcondral, são mecanismos que permitem que a cartilagem articular permaneça saudável (Ross & Dysson, 2003).

A reação dos vários tecidos que compõe uma articulação não deve ser vista isoladamente, já que estes interagem entre si em termos biomecânicos e bioquímicos. Perante a lesão traumática de uma articulação, deve-se considerar o desencadeamento de um processo inflamatório da membrana sinovial e cápsula articular - as quais se designam, respetivamente, por sinovite e capsulite - e danos físicos ou bioquímicos sobre a cartilagem articular e osso (Stashak, 2002).

A sinovite e a capsulite agudas podem levar a significativos compromissos clínicos, bem como podem conduzir ao desenvolvimento de processos degenerativos através da libertação de enzimas, mediadores inflamatórios e citocinas. Estas situações são comuns em cavalos de desporto, pensando-se estarem associadas a traumas repetidos (Stashak, 2002).

A membrana sinovial é, por si só e em termos mecânicos, frágil, propiciando o surgimento de lesões que podem comprometer a fisiologia e, conseqüentemente, a funcionalidade da articulação, já que podem afetar a difusão ou ter efeitos ao nível do metabolismo dos condrócitos (Stashak, 2002). A membrana sinovial apresenta uma superfície limitada e, nesta medida, uma quantidade finita de células sinoviais capazes de manter os níveis de ácido hialurónico. Quando as agressões são continuadas, designadamente, na presença de fragmentos que provocam alterações permanentes nas vilosidades da articulação e uma permanente diminuição no número de células sinoviais funcionais, a fibrose na membrana sinovial e a perda de superfície sinovial tornam-se muito evidentes, o que reduz as capacidades de produção de ácido hialurónico. Caso estas agressões sejam muito profundas ou prolongadas no tempo, a redução da produção de ácido hialurónico pode atingir níveis inferiores aos que mantêm a homeostasia. Desta forma, pode atingir-se uma redução crónica dos níveis de ácido hialurónico, uma redução da lubrificação do interior da articulação e uma inflamação crónica, o que provoca, de forma continuada, catabolismo do agrecano, afetando, eventualmente, a lubrificação e o funcionamento da membrana sinovial, bem como a lubrificação da cartilagem articular e a sua autoproteção (Bramlage, 2011).

Quanto à cápsula articular, as lesões graves verificadas a este nível podem causar instabilidade da articulação (Stashak, 2002).

O aumento da pressão intra-articular em casos de lesão associada a efusões, pode alterar o fluxo sanguíneo ao nível dos capilares sinoviais. Esta situação, apresenta-se suscetível de provocar, não só hipóxia dos tecidos da articulação, como também pode levar a lesões por retorno da perfusão devido à produção de radicais livres. Por seu turno, o aumento dos radicais livres de oxigénio como o anião superóxido, radicais hidroxilo e peróxido de hidrogénio no líquido sinovial de articulações lesionadas tem efeitos destrutivos, podendo conduzir à degradação das cadeias de colagénio, do ácido hialurónico e proteoglicanos (Stashak, 2002).

A membrana sinovial para além de reagir a uma agressão direta, também reage a lesões da cartilagem articular ou outra agressão mecânica de tecidos intra-articulares, por exemplo, a presença de fragmentos cartilagíneos (de desgaste) aumenta a produção de citocinas, PGE2 e metaloproteinases (tipo de proteinases como as collagenases) por parte dos sinoviócitos. A lesão ou agressão desta estrutura é bastante nefasta, isto porque são produzidas e libertadas enzimas e citocinas que alteram o ambiente intra-articular

podendo, designadamente, colocar a cartilagem articular num estado catabólico (Ross & Dysson, 2003).

As prostaglandinas (principalmente o grupo E, sobretudo a PGE2), são produzidas no decorrer de um processo inflamatório por parte dos sinoviócitos ou condrócitos em resposta à IL-1 e/ou TNF- $\alpha$ . Nas articulações a PGE2 provoca vasodilatação, diminuição de proteoglicanos da matriz da cartilagem (por degradação e por inibição de síntese), desmineralização óssea, secreção do ativador de plasminogénio e aumento da percepção da dor. A IL-1 e o TNF- $\alpha$  modulam a síntese de metaloproteinasas produzidas pelos condrócitos e pelos sinoviócitos e são importantes mediadores nas afeções das articulações (Stashak, 2002).

O *turnover* normal da matriz extracelular da cartilagem articular, é regulado pelos condrócitos através da influência e controlo de citoquinas e estímulos mecânicos.

Em presença de uma afeção articular, pode-se considerar que estes processos normais se mostram exacerbados, uma vez que as citoquinas libertadas podem induzir a depleção de proteoglicanos na cartilagem articular através do aumento da taxa de degradação ou da diminuição da síntese, em associação com a libertação de proteinases e prostaglandinas pelos condrócitos (Stashak, 2002). Desta forma, pode surgir um aumento de fricção entre as superfícies articulares, conduzindo a um desgaste, perda da cartilagem articular e da capacidade desta em proteger-se a si mesma (Bramlage, 2011).

A sensibilização dos nervos articulares, para além de fornecer informação de dor, também leva à libertação de neurotransmissores com um potencial inflamatório e que, eventualmente, podem ter efeitos deletérios no metabolismo celular da membrana sinovial e da cartilagem, contribuindo para a depleção da matriz cartilágnea (Stashak, 2002).

A estrutura e função da cartilagem articular são mantidas através de um nível intermédio de carga e da sua frequência, já que forças excessivas podem levar à destruição daquele tecido e a remoção de toda a estimulação mecânica conduz à sua atrofia (Stashak, 2002).

O desenvolvimento de esclerose no osso subcondral provoca uma redução da capacidade de absorção de choque da articulação, colocando a cartilagem em risco, principalmente sobre condições de carga impulsivas e repetitivas. No caso de o osso subcondral sofrer um processo de microfractura que evolua para macrofractura, a cartilagem articular apresenta-se susceptível de perder o suporte mecânico e, para além disso, o seu estado pode ser influenciado pela libertação de citoquinas (Stashak, 2002).

Os equinos mais ativos e em boa condição física são capazes de tolerar melhor as cargas articulares como resultado de uma maior massa muscular (possibilidade de dispersão de cargas) e de possíveis efeitos do exercício físico na nutrição da articulação (Stashak, 2002).

A artrite pode ser definida como uma inflamação da articulação. Contudo, esta definição é inespecífica e descreve muito pouco a natureza das entidades que afetam as articulações dos equinos ou o papel da inflamação em diferentes condições. Deste modo, é necessário

chegar-se a um diagnóstico específico de forma a possibilitar um o tratamento eficiente e a realização de prognósticos mais rigorosos (Stashak, 2002). No desenvolvimento de artrite ocorre efusão, devido ao aumento do fluxo sanguíneo e a alterações a nível vascular, surgindo inflamação por intermédio de importantes mediadores como as citocinas IL-1 e 6 e TNF- $\alpha$  e outros secundários como os eicosanoides (PGE2 e leucotrienos), radicais livres, substância P e NO (Stashak, 2002).

O influxo celular provoca efusão articular e consequente reconhecimento clínico de sinovite, cuja gravidade e agressões à cartilagem articular são diretamente proporcionais à contagem de células nucleadas no líquido sinovial, quer este seja infeccioso ou não. Os neutrófilos, em resposta aos estímulos quimiotáticos (como a IL-1), aumentam o seu número a nível do líquido sinovial e, devido à produção de enzimas e da alteração do ambiente sinovial, provocam danos nos tecidos circundantes (Stashak, 2002).

A isquémia resulta de pressões intra-articulares elevadas (superiores a 30 mm Hg), que provocam uma diminuição grave da perfusão da membrana sinovial e da porção fibrosa da cápsula articular. Com estas pressões, as efusões articulares são palpáveis e estão presentes em casos de sinovite proeminente. Teores baixos de oxigénio estimulam a angiogénese e a formação de tecido de granulação, resultando em fibrose. Esta torna-se exuberante em casos crónicos, sendo possível a observação artroscópica de uma membrana sinovial espessada. Durante um processo inflamatório de sinovite, a lubrificação dos tecidos moles fica comprometida devido ao aumento do líquido sinovial, consequente diluição do ácido hialurónico e redução da sua produção. O edema das vilosidades sinoviais provoca um elevado coeficiente de fricção. Em casos de ligeira efusão, verifica-se um aumento da produção de ácido hialurónico por parte das células sinoviais o que equilibra o aumento do volume de líquido sinovial. No entanto, quando a inflamação é agravada, a produção das células sinoviais é reduzida e a degradação de ácido hialurónico aumenta, atingindo mesmo uma concentração insignificante em animais que apresentem inflamação severa ou hemartrose (Ross & Dysson, 2003).

O trauma de uma articulação pode provocar uma alteração física imediata ou iniciar um processo degenerativo ou de degradação da articulação. A degradação da cartilagem articular processa-se através de uma sequência de alterações morfológicas como condromalácia e erosão, reconhecendo-se grandes alterações bioquímicas que podem preceder os defeitos morfológicos. A gravidade da sinovite, a libertação de mediadores que provocam a degradação da cartilagem articular, bem como fatores mecânicos e biológicos como a libertação de citocinas por parte do osso subcondral, podem contribuir para aquela degradação (Stashak, 2002).

Como resposta proliferativa secundária a sinovites ou ao alongamento da membrana sinovial e/ou outro tecido mole na sua inserção, podem surgir osteófitos. Estes resultam da proliferação de nova cartilagem e osso na periferia ou centro das articulações,

diferenciando-se dos entesiófitos, que se apresentam como proliferações ósseas nos ligamentos, tendões ou inserções da cápsula articular no osso. Outras causas possíveis para o aparecimento de osteófitos são a idade e a instabilidade mecânica da articulação (Stashak, 2002).

Com a exceção das fraturas ósseas, grande parte das patologias dos tecidos musculoesqueléticos não estimulam a regeneração do tecido original, isto é, o tecido perdido ou danificado não é repostado por um tecido idêntico ao original. A resposta da cartilagem às lesões é limitada e verifica-se uma incapacidade de reparação natural dos tecidos adjacentes, ou seja, não há a formação de um tecido com as mesmas propriedades morfológicas, bioquímicas e biomecânicas da cartilagem articular. Esta reabilitação torna-se ainda mais crítica nas situações em que estão presentes defeitos osteocondrais (Stashak, 2002).

Na reparação da cartilagem articular têm sido apontados três possíveis mecanismos intervenientes no processo. Uma reparação intrínseca, ou seja, feita a partir do interior da cartilagem, a qual se baseia numa capacidade mitótica limitada dos condrócitos e no aumento, embora reduzido, da produção de colagénio e proteoglicanos. Uma reparação extrínseca, realizada por elementos mesenquimatosos do osso subcondral que participam na formação de novo tecido conjuntivo que, por sua vez, pode sofrer alguma alteração metaplásica para formar elementos cartilagíneos e, finalmente, um terceiro que contribui para a reparação da cartilagem articular dos equinos ao dar origem a cartilagem que progride do perímetro da lesão em direção ao centro do defeito (Stashak, 2002).

A localização da lesão, o seu tamanho, a sua profundidade (total ou parcial), se está ou não presente em áreas de suporte ou não suporte de carga e a idade do animal, são fatores que influenciam a reparação e a remodelação de uma superfície articular lesionada (Buckwalter & Mankin, 1998, Wakitani et al., 2008 citados por Raheja et al., 2011). Nas situações em que um defeito atinge apenas parte da espessura da cartilagem (lesão parcial), verifica-se alguma reparação, dando-se o aumento da síntese de colagénio e de GAGs. No entanto, este processo nunca é totalmente eficaz.

Quando os defeitos atingem toda a espessura da cartilagem articular, a sua resposta nas áreas adjacentes, ao contrário do que acontece nas lesões mais superficiais, apenas proporciona uma reparação limitada havendo a reposição das células mortas e da matriz danificada nas margens da lesão. A restante lesão sofre crescimento de tecido fibroso subcondral que, por sua vez, pode ou não sofrer metaplasia dando origem a fibrocartilagem. No processo natural de reparação de articulações com doença degenerativa, o tecido fibroso, formado em substituição do tecido normal, é, pelo menos numa fase inicial, composto principalmente por colagénio tipo I em substituição do tipo II (Stashak, 2002).

É possível constatar que a localização e o tamanho das lesões articulares têm significado no grau da reparação, verificando-se um maior sucesso nas lesões de menor dimensão.



Quando as lesões ocorrem no osso subcondral, se não se verificar crescimento de osso no seu interior, este acaba por ser preenchido por tecido fibrocartilaginoso. No entanto, a presença de uma placa subcondral alterada, pode conduzir a uma rigidez anormal e ao desenvolvimento de tensão na junção do tecido de reparação com o osso subjacente. A propagação dessa tensão leva à degradação da fibrocartilagem de reparação e consequente exposição do osso, isto porque este tecido fibrocartilaginoso é biomecanicamente inadequado como superfície de suporte (Stashak, 2002).

A presença de um defeito de cartilagem pode não representar um compromisso clínico, por exemplo, perdas até 30% da superfície articular de um dos ossos do carpo de um equino, pode não comprometer o retorno, com sucesso, à performance anterior. Perdas de 50% ou mais severas da superfície articular ou de osso subcondral, levam a um prognóstico mais reservado. As respostas inadequadas referidas até este momento, não têm que ser, necessariamente, aplicadas a animais mais jovens ou a lesões em áreas de menor suporte de carga. Nos animais jovens, há uma maior capacidade dos condrócitos para mitose e síntese da matriz, para além da presença de vasos sanguíneos intracartilaginosos. Com a idade, a resposta da cartilagem à lesão pode ser reduzida, sintetizando os condrócitos uma matriz menos organizada e proteoglicanos progressivamente alterados (Stashak, 2002). A atividade biosintética dos condrócitos mantém-se responsiva aos estímulos mecânicos, o que faz com que o exercício e a carga mecânica sejam os fatores ambientais mais importantes, os quais se mostram responsáveis pela homeostasia da articulação e manutenção da integridade da cartilagem.

## **6.2 Anatomia e fisiologia de tendões e ligamentos**

Um tendão constitui uma grande banda de tecido conjuntivo fibroso cuja ação consiste em ser intermediário na inserção do músculo estriado com o osso, promovendo a transferência de forças nele geradas, para as suas inserções ósseas no lado oposto da articulação ou articulações de modo a promoverem o movimento (Ross & Dysson, 2003). Por sua vez, os ligamentos são bandas de tecido conjuntivo fibroso que conectam os ossos de uma articulação, impedindo-os de se desorientarem um em relação ao outro (Stashak, 2002).

Os tendões podem ser divididos em duas categorias: aqueles cuja função primária é suportar o peso do animal e aqueles cuja função primária é fletir, estender ou fazer rodar articulações (tendões de posição). Os primeiros, como por exemplo, os tendões flexores digitais, são mais elásticos que os posicionais (ex. tendões digitais extensores), o que reflete a função de armazenadores elásticos de energia. Os tendões posicionais requerem rigidez para um posicionamento exato do membro ou dígito (Ross & Dysson, 2003).

Apesar das funções serem idênticas para todos os tendões e ligamentos, nos equinos os tendões flexores digitais e o ligamento suspensor apresentam funções acrescidas. Por força

da anatomia dos membros destes animais, caracterizada pela localização proximal dos músculos e localização distal (face palmar/plantar) dos referidos tendões e ligamento, acrescida de uma hiperextensão das articulações metacarpo/metatarsofalângica, estas estruturas acabam por estar expostas a forças e a um suporte de cargas (peso) muito grandes (Ross & Dysson, 2003; Ribitsch et al., 2010).

Os tendões são compostos por tecido conjuntivo denso e têm uma organização específica que reflete as exigências mecânicas deste tecido. Consistem numa organização longitudinal de unidades denominadas fascículos (100 a 300  $\mu\text{m}$  de diâmetro) compostos, por sua vez, por fibrilhas de colagénio (tipo I) presentes no interior de uma matriz de proteoglicanos, glicoproteínas, fibras elásticas, iões e água. As células do tendão, os fibroblastos ou mais precisamente tenócitos, encontram-se nos espaços por entre os feixes de colagénio, formando filas paralelas. A estrutura do tendão compreende assim um feixe primário, unidade básica, que é constituído por feixes de fibrilhas de colagénio presentes entre as filas de fibroblastos e rodeados pelos seus processos de anastomose. Estes agrupam-se em feixes secundários ou fascículos e estes, por sua vez, juntamente com outros feixes secundários, formam os feixes terciários do tendão (Stashak, 2002).

As fibrilhas de colagénio estão orientadas em hélice ao longo do comprimento do tendão e paralelas entre si no interior do feixe primário. Apresentam-se como estruturas cilíndricas compostas, fundamentalmente, por moléculas de colagénio tipo I que seguem uma organização axial e lateral específica, desempenhando o papel de unidades fundamentais de resistência à tração do tendão. Esta resistência é determinada pelas ligações intermoleculares entre as moléculas de colagénio no interior da fibrilha e também por uma característica importante, uma ondulação ao longo do eixo longitudinal do tendão designado por “frisado”, cujo ângulo e comprimento podem ser medidos ao nível dos fascículos através do uso de uma luz polarizada. À medida que o tendão alonga, esta ondulação é perdida mais precocemente nas fibras centrais, o que faz com que estas recebam uma carga superior comparativamente às fibras mais periféricas, explicando assim as lesões centrais, mais comuns nos tendões (Ross & Dysson, 2003).

Os tendões possuem ainda uma matriz extracelular cujos componentes principais são os proteoglicanos, incluindo, por exemplo, o agrecano e a decorina. A presença destes compostos não é homogénea ao longo do tendão, reflectindo os diferentes ambientes biomecânicos e suas exigências, que existem em diferentes regiões do tendão. O agrecano, característico da matriz da cartilagem articular, é predominante nas regiões do tendão sujeitas a maiores pressões, como as regiões sobre as proeminências ósseas, tal é devido à sua resistência à pressão. Os proteoglicanos de pequenas dimensões como a decorina acabam por estar, sobretudo, nos tendões posicionais. Para além dos proteoglicanos, a matriz de tendões e ligamentos é constituída por um grande número de proteínas do tipo não colagénio como a COMP, necessária à resistência do tendão (Stashak, 2002).

Os tenócitos são essenciais para a formação e manutenção do tecido tendinoso. De acordo com a forma do seu núcleo, são distinguidas pelo menos três populações: tipo I – células com um núcleo fino e fusiforme, tipo II – grupos de células com um núcleo mais redondo, espesso e em forma de cigarro e tipo III – células tipo cartilagíneas com núcleo redondo e um nucléolo visível. A proporção destas células varia entre tendões e ligamentos, com a localização do tendão e com a idade. Os tendões jovens apresentam um maior número de células tipo II que, com a idade, dão lugar a um predomínio de células tipo I. Nas zonas sujeitas a forças compressivas, podem ser identificadas as células tipo III. A diferença na atividade dos diversos tipos de células não está muito bem esclarecida, mas assume-se que os tipos II e III serão metabolicamente mais ativos e responsáveis pela manutenção da matriz extracelular. Contudo, a atividade das células tipo I não deva ser menosprezada (Ross & Dysson, 2003).

Os ligamentos são metabolicamente mais ativos que os tendões tendo diferenças, por exemplo, na proporção de colagénio tipo II (superior ao tendão) e na população celular, que é maior e com predomínio das células tipo II (Ross & Dysson, 2003).

Os fascículos são ligados por tecido conjuntivo onde está presente o colagénio tipo III, o endotendão. Neste estão localizados vasos sanguíneos, vasos linfáticos, estruturas nervosas, fazendo a separação de populações celulares que podem ser fonte de células multipotentes (Ross & Dysson, 2003). O endotendão é confluyente com o exterior do tendão, o epitendão, que, por sua vez, consiste numa camada fina de tecido conjuntivo laxo que reveste a superfície do tendão. Exteriormente àquele, o tendão é envolvido por uma camada de tecido conjuntivo vascular, o paratendão, ou por uma bainha, quando há uma alteração da direção ou aumento da fricção. O paratendão é elástico e flexível, permitindo que o tendão seja capaz de se mover. A bainha do tendão é comparável a uma cápsula articular, consistindo numa camada exterior fibrosa e uma membrana sinovial mais interior. O revestimento sinovial forma uma dobra que envolve o tendão, dando origem a dois folhetos distintos, um parietal e um visceral, os quais são contínuos ao longo de uma dobra designada por mesotendão, cuja presença, aparentemente, nem sempre é consistente. A bainha é lubrificada pelo líquido sinovial por forma a eliminar a fricção à medida que o tendão se movimenta (Figura nº3) (Sellnow, 2006).

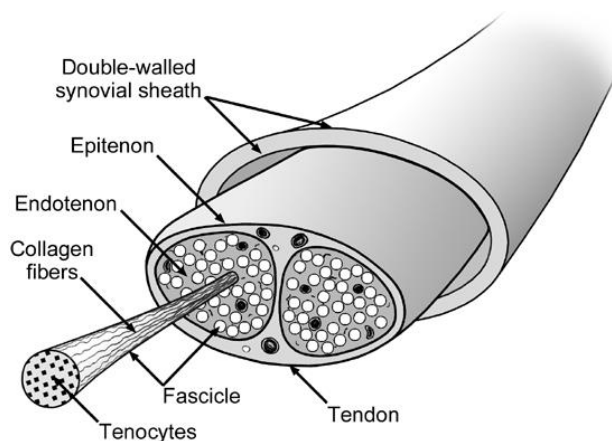


Figura 3: Estrutura do tendão  
([www.msdlatinamerica.com/ebooks/HandSurgery](http://www.msdlatinamerica.com/ebooks/HandSurgery))

Na estrutura do tendão existem ainda os ligamentos anulares ou retináculos, bandas fibrosas muito fortes cuja função é manter o tendão na sua correta posição nas regiões em que esta corre o risco de poder ser alterada (Stashak, 2002).

Os tendões obtêm nutrientes por perfusão e difusão. Esta última ocorre predominantemente nos locais onde os tendões se encontram no interior de uma bainha, locais esses onde o líquido sinovial toma grande importância na sua nutrição (Ross & Dysson, 2003). Os tendões são irrigados proximalmente, a partir do músculo (junção musculotendinosa), distalmente através do osso no qual têm inserção e a partir do mesotendão e paratendão. O músculo e o osso apenas irrigam 25% do tendão, assumindo-se assim que o paratendão tenha um papel importante nesta função (Stashak, 2002).

Podem ser observadas diferenças quanto ao suprimento sanguíneo de distintos tendões, podendo esse suprimento variar, ainda, consuante as diferentes regiões de um mesmo tendão, o exercício a que este seja submetido, a sua eventual lesão ou mesmo até com a idade do animal. Na região da articulação metacarpo/metatarsalângica, o tendão do flexor digital profundo apresenta um inferior fluxo sanguíneo, o que está associado às suas características fibrocartilágneas. A quantidade de vasos sanguíneos nesta zona é menor devido às elevadas forças compressivas, o que limita o fluxo sanguíneo (Stashak, 2002).

Aparentemente, o fluxo sanguíneo é maior nos animais mais jovens do que nos animais adultos. O exercício, por sua vez, provoca um aumento do fluxo sanguíneo, o que se verifica em animais sujeitos a um treino regular, caso contrário este aumento é retardado. As lesões provocam um aumento considerável do fluxo sanguíneo, que ocorre não só nos membros clinicamente afetados mas, dependendo das afeções, pode observar-se também naqueles não clinicamente afetados, o que é consistente, por exemplo, com a natureza bilateral da tendinite em equinos, mesmo que um membro esteja mais afetado que o outro (Ross & Dysson, 2003).

Os tendões são, predominantemente e em termos mecânicos, transmissores de energia, devido ao facto de possuírem uma grande capacidade de resistência à tensão, apesar de

possuírem uma baixa extensibilidade. Estas estruturas são ainda amplificadores dinâmicos durante a contração rápida do músculo, atenuadores de força durante o rápido e inesperado movimento e armazenadores de força elástica (Stashak, 2002).

Quando sujeito a tensão, o tendão inicialmente é capaz de acomodar (*compliance*) o que corresponde ao estender das fibras e consequente desaparecimento da ondulação na superfície do tendão. Essa situação ocorre em aproximadamente 3% da extensão do tendão, verificando-se a transição para uma maior rigidez deste em resposta a um maior esforço e *stress* (maior extensão). Ao retirar-se a ação da força, a ondulação reaparece. Posteriormente a esta fase elástica inicial e com a continuação do estiramento e *stress*, as características mecânicas do tendão alteram-se, dando lugar a propriedades viscoelásticas, mais rígidas, podendo surgir alterações estruturais irreversíveis. O tendão, quando submetido a provas mecânicas *in vitro* e relacionando o *stress* com o estiramento, é possível verificar que este passa por uma fase inicial de acomodação (fase elástica) em que as fibras vão perdendo a sua ondulação. De seguida, há a transição para a fase viscoelástica onde muitos autores consideram que pode surgir lesão residual do tendão. Posto isto, deduz-se que a atividade fisiológica normal não excederá o limite elástico. No entanto, outros autores defendem que muitas das forças a atuarem sobre os tendões encontram-se dentro da área de transição para a fase viscoelástica. Entre um nível de esforço de 3 a 5% mantém-se uma relação linear normal de stress-estiramento (fase elástica), mas a um nível de 5 a 6% sobrevém uma extensão mais rápida a qual, no limite, conduz à rutura do tendão (Anexo I). Outra questão importante é a hiperextensão e seus efeitos de perda de ondulação normal e lesão clínica. Verificou-se que na zona de 5 a 6% de estiramento, hiperextensão, o padrão ondulado normal não é recuperado depois de libertada a força tensora (Stashak, 2002).

A idade afeta também a ondulação das fibras, a celularidade e o tecido conjuntivo interfascicular, mostrando estas diminuições significativas. Em animais mais velhos pode constatar-se ainda o surgimento de metaplasia condroide e fibrocartilágnea (Stashak, 2002).

A adaptação funcional dos tendões e ligamentos ao exercício tem sido alvo de estudo. Na verdade, têm-se verificado efeitos ao nível do ângulo da ondulação e sua longitude no tendão, sobretudo em cavalos jovens, quando submetidos a programas de exercício. Estes parâmetros, revelaram-se mais baixos na região central do que na região periférica do mesmo tendão, bem como em cavalos sujeitos a maior exercício quando comparados com cavalos de controlo (de passeio). Por sua vez, estes parâmetros revelaram-se mais elevados nas fibras periféricas de cavalos em exercício de baixa intensidade quando comparados com animais de controlo, o que revela uma adaptação funcional a situações de exercício. Verifica-se, assim, que os regimes de treino têm uma grande importância na integridade dos tendões. Estes devem ser introduzidos de forma precoce e controlada na vida do cavalo, reduzindo a incidência de lesões tendinosas subsequentes na vida

desportiva ativa, uma vez que, depois da maturidade esquelética, o tendão tem uma capacidade de adaptação limitada, quer em termos das fibrilhas de colagénio, quer em termos dos restantes componentes da matriz extracelular como a COMP (Ross & Dysson, 2003).

Existem diferentes mecanismos determinantes da degeneração de tendões, entre eles, constata-se as alterações mecânicas, como a hiperextensão, que podem levar à disrupção de tendões; a atuação de forças de baixa intensidade, que podem provocar microlesões resultantes de uma matriz fatigada; a hiperémia induzida pelo exercício pode ter influência sobre a qualidade da matriz do tendão, provocando a desnaturação da matriz ou repercutindo-se na atividade normal de síntese dos tenócitos, embora se verifique que os tenócitos permaneçam viáveis com o aumento da temperatura (Stashak, 2002).

Quando aplicada uma carga máxima podem surgir alterações do fluxo sanguíneo, ou seja, este passa a ser limitado ou é eliminado no tendão, devido a forças compressivas geradas pelo seu alongamento prolongado. Isto leva ao aparecimento de hipóxia que, por sua vez, pode comprometer a sobrevivência dos tenócitos, não obstante estes demonstrarem uma maior resistência a um tal ambiente, comparativamente a outras células. Outra consequência desta hipoperfusão do tecido é a libertação de radicais livres uma vez reposta a perfusão. Nesta situação, pode ocorrer a destruição de tenócitos ou da matriz pelos radicais livres e, conseqüentemente, o surgimento de tendinites. O enfraquecimento e surgimento de tendinites pode verificar-se, também, devido à síntese, libertação ou ativação de enzimas proteolíticas, decorrente de diversos estímulos ou através de um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de várias proteínas da matriz extracelular (Ross & Dysson, 2003; Ahmad et al., 2012).

Outros fatores apresentam, igualmente, grande importância no desenvolvimento de alterações a nível de tendões e ligamentos. Por exemplo, a conformação do casco é importante para a carga sobre os tendões, sobretudo os tendões dos flexores digitais, superficial e profundo e o ligamento suspensor. Demonstrativas deste exemplo, são as situações de talões elevados em relação ao restante casco, o que resulta numa diminuição do esforço do tendão do flexor digital profundo (TFDP), do aumento da carga sobre o ligamento suspensor e, possivelmente, sobre o tendão do flexor digital superficial (TFDS).

O tipo de piso também pode ter influência sobre a carga no tendão do flexor digital superficial. Com efeito, o piso mole pode predispor a um aumento da tensão neste tendão, já que permite o afundamento do membro (Stashak, 2002).

Muitos cavalos no final das provas, apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de tendinites derivado da fadiga que, por sua vez, provoca uma incoordenação e, por isso, um aumento dos picos de carga sobre o tendão do flexor digital superficial (Stashak, 2002).

A degeneração dos tendões surge, aparentemente, relacionada com a carga, daí que quanto mais exercício e mais idade, maior o risco do animal (Ross & Dysson, 2003).

O estímulo para um aumento do *turnover* de colagénio, deposição de colagénio tipo III e a síntese de GAGs não é bem conhecido, mas pensa-se que estará associado a alterações do ambiente bioquímico como, por exemplo, na tensão de oxigénio em resultado de ciclos de carga repetitivos (Stashak, 2002).

A tendinopatia, tipicamente caracterizada por uma lesão central rodeada de tecido tendinoso relativamente intacto (Ribitsch et al., 2010), pode ser dividida em quatro fases. A primeira - fase subclínica - é difícil de identificar, quer por palpação, quer ecograficamente, uma vez que a reação inflamatória, quando presente, é mínima. A segunda é detetável em termos clínicos, sendo dividida ela própria em três: a fase aguda da inflamação, a fase subaguda reparadora e a fase crónica remodeladora (Stashak, 2002).

- A fase aguda inicia-se com o surgimento da lesão clínica e dura apenas uma a duas semanas, embora isso dependa da gravidade da lesão e da terapia anti-inflamatória iniciada. Esta fase é caracterizada por uma inflamação substancial, com hemorragia intratendinosa, aumento do fluxo sanguíneo, edema e infiltração de leucócitos, inicialmente neutrófilos e, posteriormente, macrófagos e monócitos. Se esta não for controlada, resulta na libertação de enzimas proteolíticas, que embora possibilitem a remoção do colagénio necrótico, acabam por digerir o colagénio relativamente intacto do tendão, o que pode originar a expansão da lesão (Stashak, 2002).

- A fase subaguda, que tem início poucos dias após a lesão clínica, havendo sobreposição com a fase aguda e atingindo o seu pico após três semanas. Esta fase caracteriza-se por uma forte resposta angiogénica e pela acumulação de fibroblastos no interior do tecido lesionado. Provavelmente, estes fibroblastos têm inúmeras origens incluindo os tenócitos residentes, células do endotendão e paratendão e monócitos de origem vascular. Estas células são responsáveis pela síntese de tecido cicatricial caracterizado por um arranjo desordenado de colagénio, predominantemente de tipo III (Stashak, 2002). Este tecido cicatricial apresenta uma reduzida elasticidade quando comparado com o tecido tendinoso e, por isso, a predisposição para a reincidência no local da lesão é grande (Ribitsch et al., 2010).

- A fase final é a fase de maturação em que se estabelecem ligações entre as fibras de colagénio e o tecido torna-se mais organizado (Ahmad et al., 2012).

Os episódios de reincidências perpetuam as duas primeiras fases e aumentam a porção de tendão danificado e a severidade da lesão (Stashak, 2002).

A ausência de paratendão, bem como de uma irrigação externa no interior da bainha de tendões, podem explicar uma resposta relativamente fraca no processo de reparação, nestas zonas. A formação de adesões no interior das bainhas dos tendões é responsável pela limitação do seu movimento. Contudo, proporciona um método que permite a angiogenese e a infiltração de células no tecido tendinoso lesionado no interior da bainha.

Desta forma, embora constituam um efeito deletério na função dos tendões, as adesões são uma resposta natural que facilita a reparação destes nessas regiões (Stashak, 2002).

Durante a fase crónica, que começa vários meses após a lesão, o tecido fibroso sofre uma lenta remodelação. Este processo é associado a uma conversão do colagénio tipo III a tipo I, o maior componente do tendão normal. No entanto, apesar desta conversão, o tecido não retoma as características iniciais presentes num tendão normal embora, provavelmente, seja mais funcional. Durante esta fase, o exercício controlado pode ajudar a promover esta conversão e a alinhar as fibrilhas de colagénio na direção da força, o que irá melhorar as propriedades mecânicas do tecido cicatricial. Infelizmente, as reincidências são comuns, mesmo depois desta reparação estar completa. Isto acaba por trazer consequências para o tendão contralateral ou noutras estruturas de suporte das articulações (principalmente metacarpo/metatarsofalângica) (Stashak, 2002).

O tendão, uma vez remodelado (15 a 18 meses após lesão), apresenta uma fraca elasticidade, resultando num aumento da tensão em regiões adjacentes não muito danificadas. Por isso, quando há recidiva no mesmo tendão, esta ocorre, muitas vezes, nesses locais e não no local da lesão inicial. A subsequente afeção no tendão contralateral é efetivamente uma lesão que leva a considerar uma natureza bilateral da degeneração e tendinite clínica anterior (Ross & Dysson, 2003).

Na reparação de um tendão, estão envolvidos tanto mecanismos intrínsecos como extrínsecos. Estes últimos referem-se a um crescimento de fibroblastos e capilares a partir de tecidos peri-tendinosos. Estes são os mecanismos mais importantes, sendo possivelmente os únicos em casos de severa disrupção do tendão. Intrinsecamente, as células do endotendão poderão funcionar como fibroblastos ativos. A maximização dos mecanismos intrínsecos e a minimização dos mecanismos extrínsecos conduz a um menor número de adesões peritendinosas (Stashak, 2002).

A reparação do tendão inicia-se com uma reação inflamatória, dando-se a formação de fibrina e saída de células inflamatórias de uma forma proporcional ao tamanho da lesão e gravidade do trauma. Ao existir tecido traumatizado, isquémico ou na presença de corpos estranhos, a reação inflamatória é mais exuberante, o que pode originar a formação de um excessivo tecido de granulação e deposição de colagénio (Stashak, 2002).

Os capilares do paratendão, são importantes na contribuição de oxigénio para a sobrevivência celular, para a síntese de colagénio, distribuição de células inflamatórias e fornecimento de aminoácidos essenciais para a síntese proteica. Contudo, o tendão pode e contribui significativamente para a sua própria reparação. O epitendão, tal como o endotendão, tornam-se hiperplásicos e os fibroblastos podem efetuar uma reparação primária. No entanto, muitas das lesões tendinosas no cavalo envolvem a perda de tecido tendinoso e contaminação, o que pode mascarar a reparação intrínseca primária devido à extensa resposta dos tecidos peritendinosos. Esta resposta provoca uma fibroplasia



peritendinosa e adesões e impede a restauração da função normal, sobretudo o deslizar do tendão (Stashak, 2002).

Enquanto o movimento passivo e controlado favorece a orientação longitudinal das fibrilhas de colagénio e formação de feixes durante a reparação do tendão, um movimento ativo e mais severo inibe a reparação precoce deste. Esta situação constitui o maior dilema no manejo de lesões tendinosas em equinos (Stashak, 2002).

### **6.3 Princípios gerais do diagnóstico de afeções articulares, tendinosas e ligamentosas**

A claudicação é um sinal clínico, uma manifestação de sinais de inflamação incluindo dor ou de uma alteração mecânica, que resulta num andamento anormal caracterizado por mancar ou coxear. Nem todos os cavalos com problemas musculoesqueléticos exibem uma claudicação perceptível, por isso, o reconhecimento, localização, caracterização e manejo desta são complexos (Stashak, 2002).

A agravar este quadro, existe, por vezes, uma claudicação secundária ou compensatória, sendo também comum uma claudicação concomitante dos membros anteriores ou dos membros posteriores apesar de, geralmente, o animal demonstrar sinais clínicos mais evidentes num dos membros. Desta forma, é sempre muito importante a avaliação do membro contralateral. Uma claudicação secundária ou compensatória no membro anterior ipsilateral ou contralateral do membro posterior onde se iniciou a claudicação ou vice-versa, também é frequente e, por isso, deve ser tida em conta a sua avaliação (Ross & Dysson, 2003).

Entre todos os tipos de cavalos, a claudicação dos membros anteriores é a mais comum. O centro de gravidade do animal, embora dependente da sua conformação, está mais próximo dos membros anteriores do que dos posteriores, o que faz com que o rácio distribuição de peso (carga) m.anteriores/ m.posteriores seja aproximadamente 60%:40% (Stashak, 2002). Consequentemente existe uma maior tensão sobre os tendões dos flexores desses membros tal como sobre todo o aparelho suspensor (Sellnow, 2006).

Durante certos andamentos como o trote acelerado e o galope, há momentos em que um único membro anterior suporta o peso, o que contribui para a maior predisposição a lesões. Já no passo e no trote normal, a distribuição das cargas pelos membros é mais equitativa. Com efeito, neste tipo de andamentos, um membro anterior e um posterior estão, em simultâneo no solo (idealmente, se o andamento fosse perfeitamente equilibrado) (Stashak, 2002).

O peso do cavaleiro altera também o referido rácio para 70%:30% enquanto nos cavalos utilizados nas atrelagens, devido à adição de peso na região posterior do animal, a

probabilidade de sofrerem lesões a nível dos membros posteriores aumenta (Stashak, 2002).

As disciplinas como a dressage e os saltos de obstáculos também podem alterar a ocorrência de claudicação para os membros posteriores devido ao trabalho realizado de reunião e propulsão (Ross & Dysson, 2003). No entanto, na última das mencionadas disciplinas, a receção ao solo tem também grande impacto sobre os membros anteriores (Sellnow, 2006). Nestes, cerca de 95% das causas de claudicação ocorrem ao nível do carpo ou distalmente.

No membro posterior, a região da articulação do tarso é um dos principais locais de origem de claudicação bem como a articulação metatarsofalângica e as estruturas do casco. Já nos cavalos utilizados na dressage e saltos de obstáculo, são comuns as lesões de osteoartrite e tenosinovite a nível das articulações metacarpo/metatarsofalângica, decorrentes do *stress* imposto por estas disciplinas (Stashak, 2002).

A avaliação do clínico, independentemente do estímulo iatrotópico, deve iniciar-se pela anamenese, que inclui a obtenção de informação básica como idade, sexo, raça, utilidade/nível de atividade (competição) do animal, manejo alimentar, história clínica ou a caracterização do problema atual, como a claudicação (início, associado ou não a trauma ou se piora com o exercício) (Stashak, 2002).

A realização do exame de estado geral do animal é de grande importância, obtendo-se informações básicas relativas a condição corporal, estado geral das faneras, frequência cardíaca, frequência respiratória, coloração das mucosas e tempo de repleção capilar, caracterização dos sons intestinais, temperatura retal e pulso digital. O conjunto de informações decorrentes desta fase inicial constitui o ponto de partida para a realização do exame dirigido ao aparelho locomotor. Este compreende o exame estático e o exame dinâmico, que, por sua vez, permitem uma melhor caracterização dos sinais demonstrados pelo animal. As etapas neles compreendidas são, de uma forma geral, executadas passo-a-passo. Contudo, por fatores que dizem respeito aos proprietários ou ao próprio animal, como o seu temperamento ou a severidade da claudicação (ex. fratura – o diagnóstico por analgesia exige muitos cuidados), podem sofrer alterações como a ausência de determinados passos. O primeiro componente inclui a observação do animal, enquadrado e num piso sem inclinação. Este é observado de todas as direções, recaindo a avaliação do clínico sobre a conformação (principalmente a nível dos membros), alterações de postura, sustentação do peso sobre os membros e sua direção, assimetrias (atrofias musculares, edema, efusões articulares, entre outros) e estado dos cascos (tamanho, desigualdades, altura dos talões, ferração, entre outros) (Stashak, 2002).

A palpação e manipulação dos membros podem ser efetuadas antes ou depois do exame dinâmico mas sempre de uma forma sistemática, de distal para proximal. O objetivo é detetar assimetrias, facilidade de manipulação, dor, aumento de temperatura ou alteração

da consistência dos tecidos. A palpação dos tendões e ligamentos efetuada no exame estático, quer com o membro apoiado, quer com o membro em flexão é muito importante. Esta palpação incide, sobretudo, nos tendões dos flexores digitais superficial (TFDS) e profundo (TFDP). Estes estão localizados na face palmar/plantar do ligamento suspensor. O terço proximal e o terço distal de ambos estão no interior de bainhas tendinosas, enquanto o seu terço médio está coberto apenas pelo paratendão. A sua palpação é, em primeiro lugar, feita com o membro apoiado no solo e, posteriormente, com este elevado, em flexão, com o objetivo de detetar dor, edema ou aumento de temperatura. Em condições normais, é possível palpar separadamente e diferenciar os dois tendões. Em situações patológicas, estes não podem ser separados devido a algum grau de adesão entre os dois e/ou aumento de espessura. O exame dinâmico também tem importância no diagnóstico destas afeções, sobretudo em piso mole já que neste é exigido maior esforço por parte de tendões e ligamentos (Stashak, 2002).

A avaliação do casco é feita com recurso à pinça de cascos, exercendo pressão (e percussão na parede do casco) em diferentes pontos e de forma sistemática, para deteção de sensibilidade, observando bem a sola, a sua coloração e forma (Stashak, 2002). É possível ainda realizar testes de *stress* como aqueles que sujeitam a extremidade distal do membro a angulação, avaliando-se, desta forma, o dígito e os tecidos moles associados. Alterações na angulação do casco permitem o estiramento ou compressão de ligamentos colaterais, cápsulas articulares, osso subcondral, superfícies articulares e tecidos circundantes (Stashak, 2002).

No exame dinâmico são observados os andamentos do animal nos pisos duro e mole, com o objetivo de identificar o ou os membros envolvidos e o grau de claudicação e incoordenação do movimento (Stashak, 2002). Inicialmente, o animal é observado a passo e a trote, em linha reta, em piso duro e, se o clínico o desejar, em piso mole. Esta avaliação deve ser feita dos três ângulos possíveis, ou seja, o animal deve ser observado a afastar-se, a aproximar-se e lateralmente pelo clínico. Posteriormente, o animal é observado à guia (em círculo), em ambos os pisos e sentidos, a passo, trote e, eventualmente, a galope. Nesta fase, é importante a visualização da posição da cabeça, cauda, apoio dos membros no solo, ângulo de flexão das articulações, grau de extensão da articulação metacarpo/metatarsofalângica no momento de apoio no solo e assimetria das tuberosidades coxais durante o andamento. O piso duro facilita a avaliação do andamento do animal, já que possibilita uma melhor visualização e audição do momento do apoio do membro no solo. O piso mole permite uma maior pressão sobre a sola e ranilha, o que acaba por evidenciar a claudicação com origem nestas regiões (Stashak, 2002). Idealmente, a análise do movimento do cavalo em piso duro e em piso mole devem ser comparados de modo a poder diferenciar problemas relacionados com tecidos moles e problemas envolvendo estruturas ósseas. Os animais que apresentam dor a nível do casco, geralmente pioram em

piso duro, enquanto nos casos de claudicação por lesões em tecidos moles como, por exemplo, desmite do ligamento suspensor ou tendinite, verifica-se um agravamento dos sinais no piso mole (Ross & Dysson, 2003).

Em determinadas situações pode ser pedido que o animal seja montado isto porque, a claudicação pode tornar-se óbvia nesta situação, exacerbada com o peso do cavaleiro. Igualmente, a observação do animal na subida ou descida de planos inclinados pode evidenciar determinadas claudicações, por exemplo, desmite do ligamento suspensor (Ross & Dysson, 2003).

Os testes de flexão e outras formas de manipulação são realizados com o intuito de exacerbar a claudicação ou induzi-la. Estes testes podem provocar o desenvolvimento de uma claudicação adicional, não relacionada com a primária, pelo que é necessário uma interpretação cuidadosa deste tipo de testes. Além disso, não apresentam grande sensibilidade ou especificidade e, muitas vezes, resultam em falsos-positivos e falsos-negativos (Ross & Dysson, 2003). Estes testes, quando positivos, significam que após a flexão da articulação (60 segundos), a claudicação exacerbou-se.

A anestesia local, por sua vez, é realizada com o objetivo de confirmar ou identificar a ou as zonas dolorosas, principalmente quando não se verifica uma patologia óbvia. Esta anestesia pode ser conseguida através de infiltração perineural (bloqueios nervosos), bloqueio de uma região (infiltração em anel), infiltração direta de uma região sensível ou aplicação de anestésico intrassinovial (intra-articular). Os bloqueios nervosos e a infiltração em anel são usados para restringir a origem da dor a uma região específica e, por isso, devem ser realizadas de uma forma sistemática, de distal para proximal. A infiltração direta e a anestesia intrassinovial são utilizadas para identificar o envolvimento de uma estrutura específica na origem da dor (Stashak, 2002).

Uma vez identificada a região, isto é, após a constatação de melhorias ou eliminação da claudicação por meio dos bloqueios anestésicos, procede-se ao diagnóstico por imagem. De uma forma geral, as alterações que ocorrem a nível das articulações podem ser detetadas e avaliadas com o recurso a diferentes exames complementares de diagnóstico como os raios-X, a ecografia, a análise do líquido sinovial, a termografia, a cintigrafia, a tomografia axial computadorizada (T.A.C), a ressonância magnética (R.M) e a artroscopia (Stashak, 2002).

Os sinais que decorrem de uma afeção articular podem surgir isoladamente ou combinados. Destes fazem parte as alterações da cor da pele ou da temperatura a nível da articulação, podendo esta última ser detetada através da palpação ou, de forma mais precisa, por meio de termografia. Outro dos sinais, o aumento do volume da articulação, pode ser devido a vários eventos como efusão do líquido sinovial, aumento da espessura da membrana sinovial e cápsula fibrosa (por edema ou fibrose), edema dos tecidos peri-articulares ou

proliferação óssea. A natureza deste edema depende da fase da afeção (aguda ou crónica) (Stashak, 2002).

A alteração da consistência dos tecidos (localizada ou difusa) é outro dos sinais que pode ser detetado através da palpação, fazendo-se, de preferência, a comparação com o membro contralateral (Stashak, 2002).

A dor à flexão e a crepitação durante o movimento, podem ser outros sinais presentes, bem como a claudicação e/ou movimento limitado, causados por dor, efusão articular, espasmo, contractura das estruturas peri-articulares ou anquilose fibrosa ou óssea. É possível ainda detetar deformidades devido a destruição articular, subluxação ou luxação dos ossos da articulação (Stashak, 2002).

A avaliação radiográfica das articulações revela-se um importante meio de diagnóstico da claudicação e implica a avaliação de várias estruturas ou regiões articulares, incluindo tecidos moles (intra e extracapsulares), margens articulares, osso subcondral, espaço articular, ligamentos, tendões, zonas de inserção da cápsula articular e alinhamento articular (Stashak, 2002). Para que cada articulação ou região possa ser examinada existe uma técnica radiográfica *standard* que inclui um número mínimo de projeções para a avaliação de rotina da região. De uma forma geral, para as articulações distais à úmero-radio-ulnar (URU) e femurotíbiopatelar (FTP), está indicado um mínimo de quatro projeções: LM, DPa/DPta, DPr-PaDiO e PaPr-PaDiO (Ross & Dysson, 2003).

Este exame de diagnóstico é, sobretudo, importante na avaliação do tipo e extensão da doença articular, sendo possível observar radiograficamente manifestações a nível das estruturas ósseas mas também a nível dos tecidos moles. O edema de tecidos periarticulares, distensão da cápsula articular e mineralização, são algumas das alterações de tecidos moles passíveis de serem observadas radiograficamente. A nível das margens articulares, pode ser observada a presença de osteófitos periarticulares e lise óssea, podendo ser indicativos de doença degenerativa articular e artrite séptica, respetivamente. As alterações do osso subcondral, que podem ser detetadas através deste meio de diagnóstico, consistem na esclerose, lise e fragmentação óssea. A esclerose pode estar presente na doença degenerativa articular, sobretudo nos casos mais severos ou há muito estabelecidos. A lise óssea pode estar presente nos casos de artrite séptica, doença degenerativa, osteocondrose ou artrite traumática, surgindo localmente ou na articulação em geral e associada ou não a fragmentos ósseos subcondrais (Stashak, 2002).

Quanto a alterações do espaço articular, este pode apresentar-se aumentado ou diminuído ao raio-X. O seu aumento associado a lise óssea pode ser observado em casos de artrite séptica extensa enquanto a sua diminuição, quer geral ou localizada, está associada a uma erosão da cartilagem e degeneração, ocorrendo predominantemente na doença degenerativa articular (Stashak, 2002).

A presença de entesiófitos está normalmente associada a lesão da cápsula articular, de ligamentos ou de tendões ou avulsão das suas inserções a nível ósseo. Os entesiófitos são irregulares nas fases agudas, o que os distingue dos osteófitos marginais periarticulares (Stashak, 2002).

As alterações de alinhamento articular consistem em subluxações ou luxações da articulação ou, numa posição de repouso, podem resultar de um grau anormal de flexão ou extensão da articulação. Estas alterações podem estar relacionadas com laxidão ou lesão de ligamentos, lesão de tendões ou contracturas, crescimento ósseo anormal (deformidades angulares em poldros) ou mau alinhamento pós-fratura. Alterações crónicas do alinhamento predis põem a articulação a doença degenerativa devido a anormal suporte e distribuição do peso (Stashak, 2002).

O exame radiográfico permite a visualização e interpretação de alterações como as anteriormente mencionadas, típicas de certas doenças como fraturas intra-articulares, OCD e quistos subcondrais, cujos sinais não são específicos. Já nos casos de osteoartrite e artrite infecciosa, as alterações radiográficas estão muitas vezes ausentes nos estádios iniciais da doença, só se verificando mais tarde as alterações radiográficas características. As alterações radiográficas da osteoartrite incluem uma diminuição do espaço articular, ou o seu aumento caso haja destruição das placas ósseas subcondrais, osteófitos peri-articulares (que nem sempre indicam dano da cartilagem articular) e edema dos tecidos moles (Stashak, 2002).

O exame radiográfico de duplo-contraste permite evidenciar *flaps* cartilagosos nos casos de OCD. No entanto, o seu uso é de menor importância desde que se faz uso da ecografia. Tem sido descrito o seu uso nos casos de osteocondrose e OCD da articulação escapulo-umeral para melhor avaliação da ligação da cartilagem ao osso subcondral, extensão e profundidade das lesões da cartilagem e melhor definição da localização e forma dos corpos osteocartilagosos livres (Stashak, 2002).

O exame radiológico não é um meio de diagnóstico ideal para a visualização de tecidos moles, contudo, e no que diz respeito a tendões e ligamentos, é possível a observação de regiões edemaciadas, mineralizações e eventuais reações nas zonas de inserção (Stashak, 2002).

A T.A.C pode ser útil, principalmente quando em conjunto com estudos radiográficos, sobretudo nas situações em que a imagem a três dimensões pode fornecer informação importante para o diagnóstico ou na decisão de intervenção cirúrgica e terapêutica. Estruturas subcondrais, a cortical e o trabeculado ósseo, podem ser avaliados através do T.A.C. Estruturas tendinosas de pequenas dimensões que não apresentam grande definição para que possam ser visíveis patologias mais subtis, como pequenas lesões ligamentosas, pequenas lesões tendinosas, erosão da cartilagem e alterações da cápsula articular. Tecidos moles de maiores dimensões podem ser visualizados e lesões moderadas a

severas podem ser detetadas. Este exame complementar pode ser útil na definição de fraturas intra-articulares complexas, não detetáveis ao raio-X, esclerose subcondral induzida por *stress* e outras lesões subcondrais como quistos ou defeitos ligeiros. Na maioria dos casos, a T.A.C é realizada posteriormente ao exame radiológico, complementando-o e permitindo um diagnóstico mais preciso e a tomada de decisão por uma melhor terapêutica (Stashak, 2002).

De uma forma geral e resumindo, a T.A.C está indicada para a avaliação de estruturas ósseas e, numa menor extensão, tecidos moles. As suas indicações incluem a avaliação de articulações para a avaliação de osteoartrite, doença do osso subcondral, lesões tipo quisto e fraturas complexas (Ross & Dysson, 2003).

A ressonância magnética (R.M) é um exame complementar de diagnóstico que fornece imagens de cortes seccionais semelhantes à tomografia computadorizada. Estas imagens resultam da utilização de prótons, maioritariamente de núcleos de hidrogénio, surgindo assim uma elevada qualidade de imagem. Este exame proporciona informação anatómica, patofisiologia e patognomónica intra-articular, bem como de estruturas peri-articulares de um detalhe que não estão disponíveis através de outro meio de diagnóstico, aproximando-se de tal a artroscopia. Este exame complementar é eficaz na avaliação e deteção de alterações patológicas na cartilagem articular, meniscos e na medula óssea periarticular. Podem ser detetadas: alterações erosivas da cartilagem, lesões do menisco, alterações na medula óssea periarticular devidas a esclerose óssea induzida por *stress*, a acumulação de fluido secundária a infeção ou inflamação ou ainda fraturas ocultas. Também podem ser detetadas lesões musculares, ligamentosas, tendinosas ou da cápsula articular (Stashak, 2002). A R.M é, deste modo, útil nas situações em que não foi possível detetar a origem da claudicação, não tendo sido observadas alterações radiográficas ou ecográficas. É particularmente útil em situações de claudicação com origem ao nível do casco, onde o uso da ecografia é limitado. Pode ser indicada nos casos em que a cintigrafia mostrou alterações não detetadas radiograficamente. Este exame complementar de diagnóstico apresenta grande sensibilidade para alterações subtis ao nível de tendões e ligamento suspensor, por isso, é de grande utilidade em situações em que as alterações verificadas ecograficamente são duvidosas. A imagem de articulações por ele fornecida, permite a diferenciação em graus das lesões cartilaginosas e alterações osteoartíticas. O osso subcondral e alterações patológicas a este nível podem ser detetadas através de R.M como aumentos do líquido sinovial, proliferação sinovial e aumento da espessura da cápsula articular indicativas de inflamação. Pequenas estruturas mineralizadas como, por exemplo, fragmentos ósseos não detetados radiograficamente, podem ser visualizadas através da R.M (Ross & Dysson, 2003).

A termografia é um exame imagiológico em que a imagem é produzida a partir de radiação infravermelha emitida desde a superfície da pele. Esta radiação é captada por um detetor de

fotões e convertida em impulsos elétricos, observando-se posteriormente a imagem num ecrã. Esta imagem surge composta por diferentes cores que correspondem a diferentes temperaturas à superfície da pele (Stashak, 2002).

Na verdade, a superfície da pele reflete alterações da circulação e temperatura de tecidos profundos. De uma forma geral, a termografia é usada para detetar zonas de inflamação à superfície da pele, o que vai permitir definir a extensão de uma lesão quando um diagnóstico for feito, localizar regiões alteradas para posterior orientação de outros exames de diagnóstico, detetar precocemente lesões antes que se desenvolvam sinais clínicos e acompanhar o processo de recuperação antes do animal retomar o trabalho. Como exemplos de situações clínicas específicas diagnosticáveis a partir de resultados de termografia, indicam-se: a osteoartrite subclínica (particularmente no tarso), abscessos subsolares, laminite, artrite serosa, tendinite e dor a nível de talões não associada a doença do navicular. Todavia, está indicada como uma das maiores desvantagens deste exame complementar, a falta de especificidade das alterações por ele detetadas. Por esta razão, este meio de diagnóstico deve ser considerado mais como uma técnica complementar de outros exames, bem como um procedimento de acompanhamento do desenvolvimento da doença e da recuperação do animal (Stashak, 2002).

A cintigrafia é outro dos exames complementares de diagnóstico que permite a obtenção de imagens relativas à perfusão dos tecidos e à atividade fisiológica do osso e tecidos moles. Por isso, pode ser utilizado no caso de afeções articulares (Stashak, 2002). Nos equinos, a cintigrafia é, sobretudo, utilizada em estruturas ósseas (Ross & Dysson, 2003). Esta técnica baseia-se na distribuição funcional de um radionucleotido ao longo do organismo, que, por sua vez, origina a emissão de raios-gama que são então captados, produzindo-se uma imagem. O radionucleótido mais comumente utilizado é o tecnécio 99m, podendo ser utilizadas diferentes moléculas deste radionucleotido de acordo com as suas afinidades por diferentes células. A distribuição deste está aumentada em áreas em que se verifique um aumento do fluxo sanguíneo (como em situações de edema ou inflamação) e/ou aumento da atividade osteoblástica. A observação de diminuição de perfusão é indicativa de inviabilidade dos tecidos (Stashak, 2002).

O padrão de distribuição é afetado por diversos processos de doenças. Estas alterações podem preceder as alterações radiológicas, sendo esta uma das suas maiores utilidades (Ross & Dysson, 2003). São exemplos de indicações para cintigrafia: avaliação de cavalos com múltiplas causas para claudicação; avaliação de cavalos com articulação dolorosa mas sem alterações radiográficas; determinadas fraturas em que não há alteração da posição e avaliação de articulações que não possam ser radiografadas convenientemente com o cavalo em estação (articulação coxofemoral e regiões pélvica e dorsal). Esta técnica é ainda útil para a deteção de situações de síndrome do navicular, de doença degenerativa articular, de osteoartrite, de esclerose subcondral e de artrite séptica, verificando-se um aumento da



avidez dos tecidos em relação ao normal. Embora a cintigrafia apresente uma baixa especificidade, a sua grande sensibilidade constitui uma vantagem em relação a outros meios de diagnóstico (Stashak, 2002).

A ecografia é a primeira escolha como exame complementar de diagnóstico para a avaliação de tecidos moles, sobretudo tendões e ligamentos (Ross & Dysson, 2003). Em geral, a detecção de lesões a nível destas estruturas é baseada na observação do aumento das dimensões, alteração da forma e alteração do padrão ecogénico, permitindo esta técnica determinar a localização e extensão destas lesões (Stashak, 2002).

Na realização do exame ecográfico é conveniente a comparação das mesmas estruturas no membro colateral, bem como a realização de exames seriados no acompanhamento de uma terapia, reavaliando-se assim as estruturas lesadas e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica. A avaliação de tendões e ligamentos é feita com o membro apoiado no solo, ou seja, com as estruturas sobre ação da sustentação do peso do corpo (tração) (Stashak, 2002). Para os tecidos moles a profundidades entre os 5 a 7 cm a partir da superfície da pele, deve ser utilizada uma sonda cuja frequência seja igual a 7,5 MHz ou superior. Tecidos entre os 7 a 15 cm de profundidade são melhor avaliados com sondas de 5 MHz, enquanto os localizados a profundidades ainda superiores requerem sondas de 2,5 a 3,5 MHz. As sondas lineares são as mais comumente utilizadas para a visualização de tendões e ligamentos, uma vez que facilitam o reconhecimento anatómico das estruturas e a avaliação longitudinal do alinhamento das fibras (Stashak, 2002).

Ao realizar uma ecografia é de grande importância saber a localização precisa da região a examinar e o registo das alterações observadas, de modo a ser possível um diagnóstico e a comparação numa nova avaliação. A localização anatómica da imagem ecográfica pode ser determinada através da medição da distância a partir de uma estrutura fixa (de referência) como o osso acessório do carpo ou dividindo o membro em zonas (Ross & Dysson, 2003).

Uma das técnicas ecográficas mais utilizadas para a localização das estruturas num membro de um equino, divide o comprimento do osso metacarpo em três zonas anatómicas (1 a 3) e cada uma destas zonas em subsecções (A a B ou A a C). A avaliação deve iniciar-se num plano transversal, de modo a avaliar a dimensão desta secção e ecogenicidade das estruturas. Posteriormente, a sonda deve ser colocada longitudinalmente em relação às estruturas a examinar, para estabelecimento do comprimento e morfologia das fibras dos tendões. Lesões encontradas nos planos transversais devem ser avaliadas nos planos longitudinais. Desta forma é possível estabelecer a extensão da lesão e o alinhamento das fibras dos tendões e ligamentos (Stashak, 2002).

A alteração de ecogenicidade é frequentemente observada em situações de tendinites e desmites, bem como em situações de rutura de tendões e ligamentos. A inflamação resultante leva ao aparecimento de vários graus de hemorragia, edema e infiltração celular, que conduzem a mudanças na ecogenicidade dos tecidos, nomeadamente, a sua

diminuição ou mesmo ausência (anecogénico), como se verifica nos locais de hemorragia ou rutura de tendões e/ou ligamentos (Stashak, 2002).

Durante o processo de reparação destas estruturas, o tecido normal do tendão e do ligamento pode ser substituído por tecido fibroso cicatricial, o que leva a um alinhamento aleatório das fibras e ao aumento da ecogenicidade (característico do tecido fibroso), em relação ao tecido normal. O aparecimento de calcificação ou metaplasia óssea leva à observação de uma zona hiperecoica focal associada a sombra acústica, enquanto a inflamação das bainhas tendinosas, isto é, tenosinovite, pode ser detetada através da observação do excesso de líquido sinovial e/ou aumento da espessura da bainha. A avaliação da ecogenicidade do líquido também é importante, uma vez que a verificação da sua alteração pode ser indicativo de hemorragia, presença de fibrina ou sepsis no interior da bainha. Na tenosinovite séptica a presença de fibrina e material celular pode resultar numa efusão ecogénica. A inflamação crónica da bainha tendinosa, leva ao aumento da espessura da membrana sinovial da bainha, o que a torna mais visível na imagem ecográfica. A lesão crónica da membrana sinovial e as efusões fibrinosas e sépticas podem levar à formação de aderências entre a bainha e o tendão. Quando há aumento do líquido sinovial, estas aderências são visíveis na imagem ecográfica, caso contrário é difícil a sua deteção a menos que se proceda ao exame ecográfico durante a flexão e extensão dessa região do membro. Uma avaliação cuidadosa do tendão deve ser realizada sempre que se observem aderências já que a inflamação da bainha pode ser secundária a uma tendinite.

O exame ecográfico tem também um grande valor na avaliação de articulações, como é o caso da articulação FTP (Stashak, 2002). As indicações para o exame ecográfico de articulações incluem distensão do líquido sinovial, edema local, dor na manipulação da articulação, melhorias na claudicação após analgesia intra-articular ou regional, por alterações radiográficas ou por cintigrafia (Stashak, 2002).

A alteração da ecogenicidade do líquido sinovial pode ser observada em artrites traumáticas, hemartrose ou artrite séptica. A membrana sinovial, em situações normais, é fina e apresenta uma ecogenicidade reduzida, de difícil observação, mas, em casos de inflamação crónica, deteta-se uma estrutura hiperecoica e aumentada de espessura (Stashak, 2002).

Este meio complementar de diagnóstico possibilita a avaliação de ligamentos e suas inserções na superfície óssea, bem como de meniscos e, para além disso, permite a observação da interdigitação no líquido sinovial das vilosidades sinoviais, quando estas se encontram hipertrofiadas. Irregularidades no contorno do osso subcondral e aumentos da espessura da cartilagem articular, como se verifica nos casos de osteocondrose da tróclea femoral, podem também ser detetados com recurso ao exame ecográfico (Stashak, 2002).

A deteção do aumento de espessura da cápsula articular e tecidos sinoviais por ecografia são indicadores de inflamação articular e os fragmentos osteocondrais podem ser

identificados através da observação de focos hiperecoicos associados a sombras acústicas. A rutura da membrana sinovial é mais facilmente detetada através da realização de uma artrografia de contraste (Stashak, 2002).

A avaliação do líquido sinovial deveria ser um procedimento de rotina na avaliação de condições de artrite, uma vez que proporciona informação adicional para além da que é recolhida no exame clínico e radiológico. Não permite um diagnóstico específico, mas fornece a indicação do grau de sinovite e das alterações metabólicas da articulação. No entanto, é mais específica no diagnóstico de artrites infecciosas, já que nestas situações se verifica um aumento acentuado dos valores de proteínas e leucócitos em relação a outras situações de inflamação (Stashak, 2002).

O líquido sinovial tem uma constituição muito semelhante ao plasma com o acréscimo da presença de ácido hialurónico, cuja origem é a membrana sinovial, a qual atua como uma importante barreira permeável no processo de filtração. O ácido hialurónico lubrifica a membrana sinovial, confere viscosidade ao líquido sinovial e, aparentemente, influencia a sua composição através da sua quantidade e estado físico, sobretudo em situações patológicas (Stashak, 2002).

De um modo geral, as amostras de líquido sinovial são recolhidas de forma asséptica, por meio de uma agulha e de uma seringa sendo, depois, transferidas para um tubo seco e outro contendo EDTA. O aspeto macroscópico do líquido é um dos parâmetros a ter em consideração. Este é avaliado por inspeção visual no momento da colheita, apresentando, normalmente, uma cor amarela clara, límpida e sem floculação. Podem surgir pequenas quantidades de sangue decorrentes da punção mas um aspeto hemorrágico, uniformemente difuso, é indicativo de situação de trauma agudo. Uma tonalidade amarela escura ou âmbar claro (xantocromia) é indicativo de hemorragias anteriores e estão geralmente associadas a artrite traumática crónica. A opacidade e material floculante são, por sua vez, representativos de sinovite, estando sobretudo presentes nas situações agudas. A intensa sinovite associada a uma artrite infecciosa resulta numa amostra serofibrinosa a fibrinopurulenta, apresentando, com alguma frequência, aspeto sanguinolento devido a hemorragias originadas na membrana sinovial afetada (Stashak, 2002).

O volume do líquido sinovial está aumentado na maior parte das situações de sinovite ativa e pode estar diminuído em alguns casos de doença degenerativa ou na presença de uma membrana sinovial fibrótica. Na ocorrência de OCD, o aumento de volume é variável mas uma marcada efusão sinovial é característica quando esta doença ocorre na articulação tibiotársica. O líquido sinovial está normalmente aumentado nos casos de artrite infecciosa mas depende do estadio da doença e da quantidade de fibrina presente (Stashak, 2002).

Normalmente, o líquido sinovial não coagula devido à ausência de fibrinogénio e outros fatores de coagulação (como a protrombina, facto V, fator VII e tromboplastina tissular).

Contudo, quando proveniente de uma articulação afetada, coagula e a dimensão do coágulo é, de uma forma grosseira, proporcional ao grau de sinovite (Stashak, 2002).

A concentração de proteínas no líquido sinovial, determinada através da leitura no refratômetro, é aproximadamente 25 a 35% da concentração plasmática do mesmo animal. O valor normal documentado para cavalos é de  $1,81 \pm 0,26$  g/dl, considerando-se, geralmente, uma concentração de 2 g/dl ou menor (Stashak, 2002).

Para um diferencial das proteínas presentes no líquido sinovial, outros métodos terão de ser realizados como é o caso da eletroforese. Normalmente, a concentração de albumina é maior do que no plasma enquanto aquelas referentes a  $\alpha_2$  e globulinas são menores. A concentração de haptoglobinas e outras variadas proteínas de elevado peso molecular é também inferior do que no plasma (Stashak, 2002).

As proteínas totais aumentam numa articulação inflamada e, com o seu agravamento, o valor das proteínas totais do líquido sinovial aproxima-se do plasma. Por sua vez, o valor de várias frações proteicas é comparável ao valor registado para o soro. A quantidade relativa de albumina diminui,  $\alpha_2$  e  $\gamma$ -globulinas diminui e o fibrinogénio está presente (Stashak, 2002).

A simples estimativa da concentração de proteínas totais pode ser suficiente como análise de rotina, considerando que valores acima de 2,5 g/dl são indicativos de um líquido anormal e acima de 4 g/dl são representativos de uma inflamação severa, como em situações de artrite infecciosa. Se os valores estiverem ligeiramente aumentados, deve ser realizada uma comparação com os valores normais da mesma articulação no membro contralateral. No entanto, têm sido registadas diferenças significativas nestes níveis de proteínas entre diferentes articulações do mesmo animal e observados aumentos significativos em cavalos em treino (Stashak, 2002).

A viscosidade do líquido sinovial está diretamente relacionada com o conteúdo em ácido hialurónico, sendo uma medida da quantidade e qualidade ou grau de polimerização deste composto. A determinação da viscosidade pode ser feita através da determinação da viscosidade relativa a uma temperatura específica, por meio de um aparelho que compara a viscosidade do líquido sinovial com a da água destilada. Na prática, pode ser feita uma estimativa imprecisa da viscosidade através da observação do fluído que escorre da seringa. Quando esta é normal, o fio que se forma atinge geralmente um comprimento de 5 a 7 cm. Se o fluído escorrer da seringa com a facilidade da água, a viscosidade está diminuída. Outra forma de fazer este tipo de constatação é verificar o comprimento do fio de líquido que se forma entre o polegar e o indicador ao afastá-los. Num líquido normal, este atinge os 2,5 a 5 cm enquanto em casos de menor viscosidade se observa a formação de fios menores ou dificuldade na sua formação, normalmente indicativos da presença de inflamação. Estes métodos são, obviamente, subjetivos e são apenas uteis na deteção de

alterações evidentes, não devendo ser tomadas interpretações mais profundas (Stashak, 2002).

No que diz respeito ao exame citológico da amostra de líquido sinovial (em EDTA), a contagem total de leucócitos (através de câmara de *Neubauer* ou contadores automáticos) e de eritrócitos é feita da mesma forma que no sangue periférico (com exceção do uso de um diluente salino fisiológico uma vez que o habitualmente usado possui ácido acético que precipita o complexo ácido hialurônico-proteína). Se a contagem de leucócitos for elevada, as culturas são feitas diretamente a partir de esfregaços de líquido sinovial, caso contrário, são feitas após centrifugação (Stashak, 2002).

Os eritrócitos não são considerados constituintes normais do líquido sinovial. A sua presença em pequenas quantidades, está associada a contaminação da amostra no momento da artrocentese, sendo necessário ter em atenção que a hiperémia que se verifica na membrana sinovial inflamada vai aumentar a tendência para hemorragia.

A contagem normal de leucócitos no líquido sinovial de um equino tem sido registada na ordem dos  $167 \pm 21$  e  $87$  células/mm<sup>3</sup> (Stashak, 2002). Neutrófilos, linfócitos e grandes células mononucleadas são observadas, mas a percentagem de neutrófilos é geralmente inferior a 10%. Alterações quantitativas e qualitativas dos leucócitos são indicativas da magnitude da inflamação da membrana sinovial, mais concretamente, verifica-se o aumento da contagem de leucócitos nestas situações e em casos de efusão inflamatória severa, a proporção de neutrófilos encontra-se aumentada. Os casos de artrite infecciosa têm as contagens de leucócitos mais elevadas, sendo os neutrófilos as células predominantes. Muitas vezes não se observam alterações tóxicas dos neutrófilos e presença de bactérias, sendo negativo o resultado das culturas. Normalmente, isto sucede devido à ação de antibióticos já administrados, ao sequestro de bactérias na membrana sinovial e à ação bactericida do próprio líquido sinovial (Stashak, 2002).

Outros métodos como a avaliação do precipitado de mucina (coágulo de mucina), formado após a adição de ácido acético 2% (2 ml) ao líquido sinovial (0,5 ml), podem ser utilizados para averiguar a possível existência de inflamação, já que na presença desta o coágulo apresenta alterações de consistência e a solução surge turva (Stashak, 2002).

Normalmente existe uma correlação entre as atividades das enzimas: fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AAT) e desidrogenase láctica (LDH), presentes no líquido sinovial e a severidade clínica da doença articular. O aumento proporcional da atividade enzimática do líquido sinovial pode ser devido a diversos mecanismos: libertação de enzimas por parte dos leucócitos, libertação de enzimas a partir do tecido sinovial necrótico ou inflamado ou produção e libertação de maiores quantidades de enzimas a partir de tecido sinovial alterado (Stashak, 2002).

A análise do líquido sinovial não permite definir o grau de lesão da cartilagem articular mas apenas o grau de sinovite. Têm sido, então, desenvolvidos marcadores bioquímicos e

imunológicos para identificar e quantificar produtos resultantes de danos na cartilagem. A degradação da cartilagem implica a ruptura da rede de colagénio, a perda de proteoglicanos, a presença de produtos resultantes da quebra de colagénio tipo II e fragmentos de proteoglicanos. Sendo assim, a concentração destes produtos está aumentada no líquido sinovial e finalmente no soro. Os processos imunológicos apresentam melhores resultados em termos de sensibilidade, na identificação e quantificação de componentes da cartilagem articular. Têm sido desenvolvidos anticorpos para a identificação destes elementos, sendo depois realizados radioimunoensaios ou testes de ELISA de modo a quantificá-los (Stashak, 2002).

O uso de marcadores de degradação e síntese da cartilagem serão de extrema importância na determinação do estadió da doença articular, na monitorização da terapia ou na determinação da eficácia dos agentes terapêuticos. As alterações no líquido sinovial refletem, geralmente, alterações a nível da membrana sinovial, o que daria à sua biópsia um importante valor para determinar o estadió da doença articular. Contudo, a avaliação histológica tem revelado que a reação que se observa é inespecífica, tornando a biópsia da membrana sinovial de pouco valor para o diagnóstico definitivo (Stashak, 2002).

A artroscopia constitui, não só um meio de tratamento articular, mas também de diagnóstico cujo uso se tem tornado uma rotina. Este meio permitiu ultrapassar limitações que outros métodos apresentavam, possibilitando a observação por meio do artroscópio dos tecidos moles da articulação como a membrana sinovial, vilosidades, cartilagem articular, ligamentos intra-articulares e meniscos. A avaliação de toda a articulação (ou o máximo possível) permite realizar um diagnóstico e, conseqüentemente, um prognóstico mais rigorosos. Exemplos disso, são a confirmação de uma rutura do ligamento intercarpal medial palmar, do ligamento cruzado, de uma lesão do ligamento intersesamoideu, da rutura do menisco ou a observação de hiperemia e presença de petéquias na membrana sinovial, a distribuição, forma e a proliferação das vilosidades sinoviais ou a presença de doença subcondral degenerativa e de vários graus de osteoartrite (Stashak, 2002).

Este meio apresenta muitas vantagens em relação à artrotomia, já que possibilita uma visualização melhorada da articulação e das suas estruturas como as vilosidades, impedindo que estas colapsem, estando suspensas no fluido de lavagem intra-articular. A artroscopia tem como maior vantagem, a obtenção de informação sobre alterações a nível da cartilagem articular (Ross & Dysson, 2003), sobretudo, quando o resultado do exame radiológico é inconclusivo. Esta técnica possibilita o reconhecimento de erosão ou linhas de desgaste da cartilagem e, por vezes, a deteção de fragmentos não visíveis nas radiografias. Nestes casos, para além da sua remoção, permite averiguar a extensão das lesões da cartilagem e osso (Stashak, 2002). Em casos de artrite séptica, a artroscopia é útil na avaliação das superfícies articulares e membrana sinovial, na identificação e remoção de corpos estranhos, na remoção de fibrina e na realização de lavagens articulares mais

completas e eficazes. A artroscopia pode igualmente facilitar a inserção de drenos, a realização de sinovectomias, e o desbridamento ou remoção de defeitos osteocondrais (Ross & Dysson, 2003).

A ampliação e pormenor do artroscópio são outras das vantagens que esta técnica proporciona, bem como a redução de trauma e morbilidade infligidas, realizando-se apenas pequenas incisões. Desta forma, a possibilidade de complicações é reduzida e a capacidade funcional da articulação é recuperada mais precocemente (Ross & Dysson, 2003).

#### **6.4 Princípios gerais do tratamento de articulações, tendões e ligamentos**

Aproximadamente 60% dos casos de claudicação em equinos estão relacionados com osteoartrite, destruição progressiva da cartilagem articular (McIlwraith, 2010). Esta doença degenerativa apresenta episódios inflamatórios intermitentes e é induzida por fatores mecânicos e biológicos que interferem no equilíbrio natural entre a síntese e degradação da cartilagem. Estes fatores, juntamente com os episódios inflamatórios, conduzem à degradação e perda de cartilagem articular, à esclerose do osso subcondral e à formação e osteófitos (Fritz et al., 2006 citado por Ribitsch et al., 2010). Esta doença pode ser hereditária ou induzida por trauma, vários microtraumas ou exercício muito intenso (Frisbie et al., 2006 citado por Ribitsch et al., 2010) e provoca dor e diminuição do movimento. Daqui se depreende que a rápida resolução de uma sinovite e capsulite constitui uma parte essencial do tratamento médico de doenças articulares, isto porque estas provocam a degradação da cartilagem articular através da libertação de produtos de inflamação, conduzindo ao desenvolvimento de osteoartrite.

O objetivo do tratamento das articulações baseia-se, assim, em dois princípios: o retorno à função normal da articulação o mais rápido possível e a prevenção da ocorrência ou redução da severidade da osteoartrite, por outras palavras, o tratamento visa reduzir a dor e minimizar a progressão da deterioração da articulação. Outros pontos críticos da prevenção de osteoartrite são: a remoção atempada de fragmentos osteocondrais, caso estejam presentes na articulação, a redução ou fixação atempada de grandes fraturas intra-articulares, o diagnóstico de lesões ligamentosas e dos meniscos através de artroscopia e a realização de um tratamento apropriado para a OCD (McIlwraith, 2010).

Tendo em consideração os objetivos referidos, a abordagem terapêutica do médico veterinário está dependente de diversos fatores como: a doença articular presente, a articulação envolvida, o estadió da doença, a utilização corrente ou intencional do animal, a sua idade, os fármacos de administração permitida em competição, o custo do tratamento e a resposta à terapia (Ross & Dysson, 2003).

Os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) são dos fármacos mais utilizados em medicina desportiva equina. Estes atuam inibindo componentes do sistema enzimático que promove a

conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxano (McIlwraith, 2010). Ao inibir o metabolismo do ácido araquidônico, reduz-se, de forma pronunciada, a dor (Ross & Dysson, 2003). As prostaglandinas, particularmente as E (PGE<sub>2</sub>), estão associadas à inflamação sinovial e à deterioração da matriz da cartilagem articular, estando presentes no líquido sinovial de articulações osteoartíticas (Ross & Dysson, 2003).

O AINEs mais comumente administrado é a fenilbutazona numa dose de 2,2 mg/Kg SID ou BID (metade da dose recomendada habitualmente – 4,4 mg/kg), tendo sido constatada uma redução da claudicação mais exuberante na administração da combinação de fenilbutazona e flunixin meglumine. Contudo, esta combinação apresenta efeitos secundários preocupantes, incluindo o desenvolvimento de colite aguda necrosante (Frisbie et al., 2009 citado por McIlwraith et al., 2010). O ketoprofen, o carprofen ou o naproxen pertencem igualmente a este grupo de fármacos e têm também uso na medicina equina.

Os AINEs têm algum grau de inibição da atividade das ciclooxigenases. A COX-1 e COX-2 são duas destas isoenzimas tendo a primeira um papel importante no equilíbrio do funcionamento fisiológico dos sistemas gastrointestinal e renal e menor importância em termos inflamatórios, ao contrário da COX-2, por sua vez associada a fenómenos inflamatórios, sobretudo, os desempenhados por macrófagos e células sinoviais (McIlwraith, 2010).

No desenvolvimento de fármacos que inibem seletivamente a COX-2 surgiu, por exemplo, o firocoxib, fármaco utilizado no controlo da dor e da inflamação associados à osteoartrite em cavalos (McIlwraith, 2010). Os inibidores de COX-2 apresentam resultados promissores na redução dos riscos de efeitos secundários como o aparecimento de úlceras gastrointestinais e a nefrotoxicidade (Ross & Dysson, 2003).

Têm sido estudados eventuais efeitos condroprotectores e o potencial deletérico destes fármacos, no entanto, a relevância clínica dos resultados não é clara. Certos AINEs são conhecidos por inibirem a atividade anabólica dos condrócitos enquanto outros estimulam a síntese da matriz cartilágnea (Ross & Dysson, 2003). No entanto, enquanto não existir a associação clínica entre o uso de fenilbutazona e a degeneração da cartilagem articular, continua a ser apropriado o uso de AINEs (McIlwraith, 2010).

Os corticosteroides são os anti-inflamatórios mais potentes a nível das articulações. Geralmente são administrados intra-articularmente, atuando na depressão de vários processos inflamatórios, incluindo a vasodilatação capilar, a marginação, a migração, a acumulação de células inflamatórias e a libertação de enzimas, citocinas e outros mediadores inflamatórios. Atuam também inibindo a produção de prostaglandinas através da inibição da fosfolipase A<sub>2</sub> e COX-2 (Ross & Dysson, 2003).

O uso intra-articular destes fármacos gera controvérsia na medida em que pode haver um potencial agravamento das lesões cartilágneas presentes, devido aos seus efeitos a nível do metabolismo dos condrócitos. Em grandes concentrações, os corticosteroides inibem a



síntese de proteoglicano e influenciam a organização da estrutura do colagénio cartilágneo. Para além destes, há ainda a possibilidade de provocarem outros efeitos deletérios (dose-dependentes) que, para alguns autores, estão sobrevalorizados (Ross & Dysson, 2003). Estudos há, no entanto, que demonstram a existência de efeitos condroprotectores, sobretudo em baixas concentrações.

Os corticoesteroides mais utilizados são: o acetato de metilprednisolona, o acetonido de triancinolona e os ésteres de betametasona. Estudos de utilização destes fármacos indicaram que o uso de metilprednisolona leva a uma redução, embora não muito significativa, do grau de claudicação, verificando-se ainda uma importante diminuição da concentração de PGE2 no líquido sinovial e uma redução da hiperplasia e vascularização da íntima sinovial. No entanto, houve evidências de efeitos deletérios da administração intra-articular deste fármaco uma vez que foram registadas alterações da cartilagem articular (Ross & Dysson, 2003).

O uso de triancinolona conduz a uma diminuição do grau de claudicação e a uma melhoria dos parâmetros morfológicos do líquido sinovial, membrana sinovial e cartilagem articular, o que leva a constatar que o seu uso, especialmente em articulações de grande movimento, é interessante. Um dos maiores receios do uso de triancinolona é o risco de ocorrência de laminites. No entanto, estudos têm demonstrado que não existe uma associação entre o desenvolvimento desta e o uso intra-articular de triancinolona, existindo mesmo estudos que demonstram o contrário, que este fármaco será eficaz e que apresentará propriedades condroprotectoras (Ross & Dysson, 2003).

Os corticoesteroides são, em regra, combinados com o ácido hialurónico, tendo este um papel de proteção contra os seus efeitos deletérios (McIlwraith, 2010). Desta forma, é possível reduzir-se a dose de corticosteroides e beneficiar-se das propriedades do ácido hialurónico (Ross & Dysson, 2003).

O ácido hialurónico, GAG não-sulfurado, apresenta discretos efeitos analgésicos e efeitos anti-inflamatórios, inibindo células inflamatórias, mediadores e permitindo a hidratação (McIlwraith, 2010). Esta molécula melhora o grau de movimento da articulação através de melhorias na viscosidade do líquido sinovial e na lubrificação dos tecidos moles, estimulando ainda a síntese de proteoglicanos pelos condrócitos (Ross & Dysson, 2003). Outros estudos indicam, também, uma proteção contra a síntese de prostaglandinas induzidas por IL-1, bem como a inibição de radicais livres. O uso isolado de ácido hialurónico pode ser útil em casos de sinovite, ligeiros a moderados, mas para a maioria das situações clínicas será necessário o uso conjunto de corticosteroides (McIlwraith, 2010).

Os glicosaminoglicanos polisulfurados (PSGAG) são um grupo de polissacáridos que têm sido indicados como condroprotectores e como tendo propriedades anti-inflamatórias devido à inibição de síntese de PGE2 e de libertação de citocinas. Estes compostos estimulam ainda a produção de ácido hialurónico por parte dos sinoviócitos e a síntese de

proteoglicanos e colagénio pelos condrocitos. Os PSGAG são capazes de inibir a atividade de várias enzimas que se encontram presentes nos tecidos articulares como, por exemplo, a elastase (Ross & Dysson, 2003). O seu uso terapêutico tem como objetivo prevenir, retardar ou reverter as lesões macroscópicas da cartilagem decorrentes de osteoartrite, sobretudo, a prevenção da degeneração da cartilagem articular.

O mais importante composto deste grupo é o sulfato de condroetina e a principal administração intra-articular daqueles compostos ocorre em situações de sinovite severa (aguda), existindo estudos demonstrativos de que estes compostos permitem uma rápida resolução de sinovites e hemartroses (McIlwraith, 2010) e que a efusão do líquido sinovial, o grau de vascularização da membrana sinovial e a fibrose da subíntima sofrem uma considerável diminuição (Frisbie et al., 2009 citado por McIlwraith, 2010).

Polisulfato de pentosan é um composto heparinoide cujo uso em modelos de osteoartrite em equinos tem revelado diminuições significativas das alterações da cartilagem articular e uma grande tendência para melhorias na histologia da cartilagem e de parâmetros como claudicação, flexão articular ou de produtos de degradação do colagénio presentes no líquido sinovial (McIlwraith, 2010). Aparentemente este composto apresenta efeitos semelhantes aos PSGAG incluindo a promoção da atividade anabólica de condrócitos e sinoviócitos e a inibição de enzimas que promovem a degradação de compostos. Está presentemente apenas disponível na Austrália (Stashak, 2002; Ross & Dysson, 2003).

Os suplementos orais para articulações, constituem uma lista de produtos vendidos como sendo suplementos dietéticos com a intenção de prevenção ou tratamento de doenças. Fornecidos aos animais com a intenção de melhorar a claudicação, de os tornar saudáveis ou para prevenir o desenvolvimento de qualquer problema articular, estes produtos não apresentam, no entanto, valor nutritivo. A sua maioria inclui glucosamina e/ou sulfato de condroetina juntamente com outros compostos. Nenhum destes suplementos orais está licenciado e, em termos gerais, não existe qualquer evidência quanto à sua eficácia (McIlwraith, 2010).

O sulfato de glucosamina, bem como o sulfato de condroetina demonstraram propriedades condroprotectoras e anti-inflamatórias, nomeadamente, o estímulo da síntese de proteoglicanos, a inibição de atividade de algumas enzimas e a ação sobre leucócitos (Ross & Dysson, 2003).

Tendo como objetivos principais o alívio sintomático e a não progressão da doença articular do cavalo de desporto, a combinação que mais frequentemente se utiliza no tratamento articular é a de ácido hialurónico e corticoesteroides. Sem estes últimos, a eficácia intra-articular do ácido hialurónico limita-se a uma ligeira a moderada sinovite, sendo marcadamente aumentada na presença de corticoesteroides (McIlwraith, 2010).

Dependendo da doença e do estadio desta na articulação, o tratamento dessa estrutura pode envolver procedimentos como a curetagem do osso subcondral, fixação de *flaps* de

cartilagem, desbridamento cirúrgico, microfracturas e remoção de porções de menisco (Raheja et al., 2011), lavagens intra-articulares (com ou sem aplicação de antibióticos), sinoviectomias ou mesmo a artrodese cirúrgica (em articulações de reduzido movimento e em casos severos de osteoartrite) (Stashak, 2002).

Não existe consenso na duração do repouso após a administração intra-articular. As recomendações variam entre o retorno imediato ao exercício, até 30 dias de repouso antes do treino habitual. A natureza e a severidade da afeição têm de ser tidas em consideração e apesar dos corticosteroides intervirem nas propriedades mecânicas da cartilagem, uma carga normal sobre esta é benéfica em termos metabólicos. Já uma carga exagerada pode cooperar com os efeitos inibitórios dos corticosteroides no metabolismo da matriz cartilagínea (Ross & Dysson, 2003).

É de bom senso, que após a aplicação intra-articular de corticosteroides o animal permaneça na boxe (repouso) dois ou três dias antes de um regresso gradual a um treino leve, que se deve iniciar pelo caminhar. As mesmas recomendações são dadas no caso de aplicação de ácido hialurónico e PSGAG (Ross & Dysson, 2003).

Ao longo dos últimos anos, tem-se verificado o reconhecimento de que os protocolos de reabilitação (fisioterapia) apresentam inúmeras vantagens relativamente ao confinamento. Os métodos de reabilitação que, atualmente, estão mais em voga, consistem no uso de passadeiras, piscinas ou a combinação de ambas (McIlwraith, 2010).

A terapia de *shock wave* tem sido recentemente utilizada e o seu valor no tratamento, designadamente, de osteoartrites tem-se verificado ao nível da diminuição da resposta inflamatória da membrana sinovial e da cápsula articular e, conseqüentemente, da diminuição da claudicação (McIlwraith, 2010).

O tratamento de lesões tendinosas e ligamentosas, implica uma combinação de terapia atempadamente aplicada, bem como uma reabilitação a longo prazo. O objetivo é reduzir a inflamação, manter a perfusão dos tecidos e diminuir a formação de tecido cicatricial.

A terapia habitual inclui anti-inflamatórios sistémicos e locais (Fenilbutazona, DMSO) e terapia fria como a aplicação de gelo ou duches frios. O dimetilsulfóxido (DMSO) aplicado localmente, desempenha um importante papel na redução de edema, remoção de radicais livres e vasodilatação (Stashak, 2002). Os corticoesteroides podem ser administrados sistémica e localmente. Contudo, nesta última, têm apresentado efeitos deletérios, inibindo a síntese de GAG e colagénio, provocando a necrose das fibras de colagénio, morte celular e calcificação distrófica. A administração local de ácido hialurónico, em torno do tendão ou intravenoso, pode trazer benefícios anti-inflamatórios.

Um aspeto importante do tratamento na fase aguda consiste em promover um suporte adequado para o tendão lesionado, através de bandagens ou ligaduras. Estas têm de estar corretamente aplicadas de modo a evitar a constrição do tendão e o conseqüente agravamento da lesão.

Em situações clínicas mais severas, pode haver necessidade de recurso a procedimentos cirúrgicos designadamente desmotomia, tenotomia ou, de uma forma menos invasiva, à técnica de *splitting*.

O repouso e confinamento do animal é uma das primeiras medidas que usualmente se toma. A permanência na boxe, sendo apenas permitido o caminhar é, normalmente, exigido nos primeiros tempos após lesão. O aumento da atividade física do animal depende da evolução da lesão e respetiva imagem ecográfica. O núcleo desta diminui, geralmente, nos primeiros dois meses, período a que se segue uma diminuição da área transversal.

Dependendo do grau das lesões tendinosas e ligamentosas, o seu tratamento apresenta-se mais ou menos prolongado. Todavia, qualquer que seja essa lesão, recomenda-se uma restrição de atividade atlética durante um período mínimo de seis meses, de forma a proporcionar uma cabal cicatrização (Stashak, 2002).

## **7. Aplicação de terapias regenerativas celulares na doença articular de equinos**

O objetivo do tratamento do animal com osteoartrite reside no controlo da dor e na melhoria da função da articulação e qualidade de vida. Porém, não existem terapias farmacológicas ou cirúrgicas eficazes na alteração do curso patológico da doença (Felson et al., 2000 citado por Ribitsch et al., 2010; Frisbie & Stewart, 2011). Por esta razão e devido ao impacto significativo da doença articular na performance dos equinos e à fraca capacidade de reparação da cartilagem articular, têm-se feito esforços no sentido da utilização das terapias regenerativas (Ribitsch et al., 2010).

A cartilagem articular possui uma evidente incapacidade de reparação natural (Vachon et al., 1986, Hurtig et al., 1988, Hanie et al., 1992, Strauss et al., 2005, White et al., 2006 citados por Frisbie & Stewart, 2011) como consequência de uma relativa hipocelularidade e de uma natureza avascular do tecido que a constitui. Nos cavalos de desporto, esta situação agrava-se devido às exigentes cargas e *stress* a que as superfícies articulares normalmente ficam sujeitas durante a competição (Frisbie & Stewart, 2011).

Várias estratégias têm sido desenvolvidas no sentido de promover esta reparação como, por exemplo, os enxertos. Estes podem ser de diversos tipos, nomeadamente, enxertos de perióstio (Vachon et al., 1991 citado por Frisbie & Stewart, 2011), enxertos esternais (Vachon et al., 1992, Howard et al., 1994 citados por Frisbie & Stewart, 2011), enxertos osteocondrais ou artroplastia em mosaico de enxertos osteocondrais (Desjardins et al., 1991, Pearce et al., 2003 citados por Frisbie & Stewart, 2011). Enquanto as duas primeiras técnicas não provaram ser clinicamente viáveis, a artroplastia em mosaico apresenta desvantagens como: o número limitado de locais dadores, a recolha do enxerto que acarreta uma cirurgia adicional e a morbilidade do local intervencionado ou um sucesso dependente

da capacidade técnica de colocação do enxerto na superfície articular (Desjardins et al., 1991 citado por Frisbie & Stewart, 2011). Quanto aos enxertos osteocondrais em equinos, apesar de serem poucos os resultados relativos à sua utilização, há trabalhos animadores que os indicam como possível alternativa à artroplastia em mosaico (Pearce et al., 2003 citado por Frisbie & Stewart, 2011).

A técnica de microfractura constitui outra das estratégias utilizadas. Esta permite o acesso de células progenitoras condrogénicas presentes no compartimento da medula óssea subcondral, à base dos locais a reparar na cartilagem (Kold & Hickman, 1986, Koelling et al., 2009 citados por Frisbie & Stewart, 2011). Estudos demonstraram benefícios da microfractura na reparação da cartilagem articular de equinos, comparando com o desbridamento (Frisbie et al., 1999 citado por Frisbie & Stewart, 2011). Mais recentemente verificou-se que esta reparação é favorecida pela completa remoção da porção de cartilagem calcificada diretamente acima da placa subcondral (Frisbie et al., 2006 citado por Frisbie & Stewart, 2011) ou através do preenchimento dos defeitos, designadamente com fatores de crescimento (Nixon et al., 1999 citado por Frisbie & Stewart, 2011) ou concentrado de medula óssea (Fortier et al., 2010 citado por Frisbie & Stewart, 2011).

A implantação articular de condrócitos expandidos em laboratório, consiste numa outra técnica que tem evidenciado bons indicadores, a curto e a longo prazo, na reparação de defeitos na cartilagem articular de equinos (Frisbie et al., 2009, Nixon et al., 2011 citados por Frisbie & Stewart, 2011). Recentemente, esta técnica tem sofrido alterações, alvo ainda de estudos, nomeadamente a incorporação de géis suplementados com fatores de crescimento (Fortier et al., 2006 citado por Frisbie & Stewart, 2011), ou o uso de condrócitos geneticamente modificados de modo a ocorrer a sobre-expressão de determinadas proteínas (Hidaka et al., 2003 citado por Frisbie & Stewart, 2011) ou fatores de crescimento (ex: IGF-1) (Goodrich et al., 2007 citado por Frisbie & Stewart, 2011), importantes na reparação da cartilagem, estimulando a produção de matriz, síntese de colagénio tipo II e preservação do fenótipo dos condrócitos (Nixon et al., 1999, Fortier et al., 2002 citados por McCarthy et al., 2011).

Noutro estudo procedeu-se à implantação de fragmentos autólogos de cartilagem, igualmente com efeitos positivos para esta reparação (Frisbie et al., 2009). Contudo, a complexidade na recolha da cartilagem, o processo de expansão, a possibilidade de alteração das características dos condrócitos durante a cultura (Ribitsch et al., 2010), a reimplantação cirúrgica, os meios técnicos e logísticos exigidos, os custos envolvidos e a falta de resultados clínicos dificultam a aposta nestes procedimentos clínicos (Frisbie & Stewart, 2011).

Mais recentemente, a bioengenharia tem realizado diversos estudos relativos a bioestruturas acelulares (ex.: estruturas de hidrogel ou biocerâmica) que demonstraram ser igualmente eficazes na reparação da cartilagem articular como as celulares (Frisbie & Stewart, 2011).

Estas terão como objetivo mobilizar células progenitoras e fornecer um suporte físico e químico (pistas solúveis) de estímulo para uma ideal reparação ou regeneração destas. As células progenitoras são importantes, conseguindo dividir-se e produzir mais células a um ritmo superior que os condrócitos. Além disso, mantêm o fenótipo quando expandidas em cultura (McCarthy et al., 2011). Esta técnica dependerá, no entanto, de uma população celular capaz, disponível no animal (Frisbie & Stewart, 2011).

Muitos dos estudos em torno da reparação da cartilagem articular envolvem o uso de MSCs aproveitando a sua capacidade de diferenciação condrogénica e, ao contrário dos condrócitos, um maior potencial de proliferação em cultura podendo ser expandidas de modo a obter células suficientes para engenharia de tecidos (Csaki et al., 2008). De um modo geral, os trabalhos desenvolvidos em animais de laboratório apresentaram respostas positivas na aplicação deste tipo de células nos defeitos cartilagíneos. No entanto, existem dificuldades na determinação da relevância clínica destes resultados em animais de maiores dimensões e de maior mobilidade como é o caso dos equinos. Contudo, um estudo em humanos, embora com resultados positivos modestos, revelaram a possibilidade de implantação destas células o que poderá ser extensível para os equinos (Frisbie & Stewart, 2011).

São ainda poucos os estudos apresentados em torno da reparação da cartilagem articular de equinos mediante o uso de MSCs, contribuindo para tal o grande porte destes animais e consequente peso exercido ao nível das articulações, o que dificulta a sua recuperação (Brehm et al., 2012). Um destes envolve a técnica de implementação das células estaminais por meio de estruturas constituídas por materiais sintéticos ou naturais, geralmente colocadas e fixadas ao nível dos defeitos da cartilagem. Esta técnica é exigente, sendo necessário a preparação das células estaminais autólogas antes da realização da artroscopia ou no instante imediato após a implantação da matriz de suporte no defeito (Ribitsch et al., 2010). Por vezes, esta artroscopia é de diagnóstico, o que pode levar ao gasto de recursos desnecessários caso não seja identificada a lesão (Frisbie & Stewart, 2011). Além disso, para a realização desta artroscopia recorre-se à insuflação da cavidade articular, o que requer equipamento especializado. No entanto, alguns estudos não têm demonstrado resultados positivos a longo prazo na aplicação daquelas estruturas na reparação da cartilagem (Wike et al., 2007 citado por Frisbie & Stewart, 2011). Num estudo com MSCs de origem medular, um dos possíveis problemas consiste na possibilidade de hipertrofia cartilaginosa, que é deficiente em propriedades funcionais em relação à hialina e que pode conduzir ao aparecimento de mineralizações ósseas (McCarthy et al., 2011).

As MSCs também têm sido utilizadas na expressão local de determinados genes. Estes genes estão relacionados, por exemplo, com a expressão de moléculas que podem melhorar a qualidade da reparação da cartilagem. Efetivamente, os estudos em roedores têm demonstrado melhorias nesta reparação ao contrário do que se verificou nos grupos

onde foram aplicadas células estaminais naïve. Nestes os defeitos cartilagíneos foram preenchidos por tecido fibroso ou fibrocartilaginoso, revelando que apenas a capacidade de diferenciação condrogénica talvez não seja eficaz na reparação (Grande et al., 2003, Park et al., 2006 citados por Frisbie & Stewart, 2011).

Outra estratégia que envolve as MSCs, implica a aplicação direta destas células no espaço articular, sem o uso de uma estrutura de suporte, 30 dias após a artroscopia diagnóstica, permitindo assim uma preparação do material a aplicar. Esta técnica, mais prática e mais comumente usada pelos clínicos (Ribitsch et al., 2010), revelou melhorias na reparação dos defeitos das cartilagens de articulações sujeitas à aplicação de células estaminais ( $2 \times 10^6$  células) juntamente com ácido hialurónico, quando comparado com as articulações tratadas apenas com este último composto. Estas melhorias tornaram-se evidentes, a longo prazo, nomeadamente, no que concerne à firmeza e qualidade do agregado formado (McIlwraith et al., 2011 citado por Frisbie & Stewart, 2011). Estudos em modelos porcos também permitiram verificar que a administração intra-articular direta de MSCs será mais vantajosa, inclusive a longo prazo, quando em comparação com a aplicação direta na cartilagem de uma estrutura de suporte contendo as células estaminais (Lee et al., 2007 citado por Frisbie & Stewart, 2011).

Noutro estudo realizado em equinos, demonstrou-se melhoria no conteúdo de agregado no preenchimento dos defeitos cartilagíneos, parte importante na sua reparação. Tal pode ser benéfico para a durabilidade e qualidade do tecido de reparação, sobretudo na sua capacidade de resistência à compressão e firmeza (Frisbie & Stewart, 2011).

Os condrócitos presentes nas articulações inflamadas (osteoartríticas) são fenotipicamente e biosinteticamente disfuncionais (Yagi et al., 2005, Sato et al., 2006, Aigner et al., 2006 citados por Frisbie & Stewart, 2011), tendo surgido até evidências não consistentes de que as células estaminais nelas presentes serão também disfuncionais (Murphy et al., 2002 citado por Frisbie & Stewart, 2011). No entanto, o líquido sinovial de articulações osteoartríticas contém uma variedade de fatores quimiotáticos aos quais as células mesenquimatosas precursoras de condrócitos e presentes no osso subcondral são responsivas (Frisbie & Stewart, 2011). Além disso, verifica-se a secreção de fatores morfogénicos por parte dos condrócitos destas articulações, que estimulam a diferenciação condrogénica das MSCs em populações com características fenotípicas articulares e não endocondrais (Aung et al., 2011 citado por Frisbie & Stewart, 2011).

Existem, deste modo, condições moleculares para o recrutamento das células estaminais, mas, em situações de osteoartrite não tratada, este só ocorre após estar instalado um estadio avançado da doença e de ser ultrapassada a região de cartilagem calcificada. Tais barreiras são transpostas, por exemplo, com a técnica de microfractura (Frisbie & Stewart, 2011).

As MSCs são capazes de aderir à superfície da cartilagem articular na ausência de outros substratos (Coleman et al., 2010, Koga et al., 2008 citados por Frisbie & Stewart, 2011) mas, de acordo com vários estudos, após a sua aplicação no espaço articular estas células localizaram-se preferencialmente nos tecidos moles articulares, participando da sua reparação incluindo ligamentos cruzados e meniscos. A adesão à cartilagem articular e seus defeitos foi pouco expressiva, a menos que aplicadas em quantidades suficientes (Koga et al., 2008, Agung et al., 2006, Jing et al., 2008 citados por Frisbie & Stewart, 2011 e por McIlwraith et al., 2011).

Sendo assim, os efeitos benéficos da administração destas células a nível da cartilagem pode ser resultado da mediação de fatores solúveis ou de efeitos primários noutros tecidos articulares, nomeadamente as suas ações anti-inflamatórias como a inibição de linfócitos T ou a estimulação da secreção de interleucinas anti-inflamatórias (González et al., 2009, Zheng et al., 2008 citados por Frisbie & Stewart, 2011), que acabam por permitir a redução de danos a nível da cartilagem articular (Augello et al., 2007 citado por Frisbie & Stewart, 2011).

Diversos estudos em diferentes modelos animais como coelhos, caprinos e humanos, relativos a osteoartrite, têm revelado boas respostas após a administração intra-articular de MSCs. Na verdade, foi verificada a redução da degeneração da cartilagem articular, da formação de osteófitos e esclerose do osso subcondral e a reversão de algumas alterações artríticas (Toghraie et al., 2011 citado por Frisbie & Stewart, 2011); a restauração do volume da cartilagem e melhorias nos sinais clínicos alguns meses após a administração (Black et al., 2007, Black et al., 2008 citados por Ribitsch et al., 2010 e Centeno et al., 2008 citado por Frisbie & Stewart, 2011), bem como melhorias na estrutura da cartilagem (Fortier, 2009; Oshima et al., 2005 citado por Ribitsch et al., 2010).

Estudos realizados em equinos, com a administração de MSCs de origem medular e de origem adiposa, revelaram melhorias significativas principalmente na aplicação das primeiras (Frisbie & Stewart, 2011). Verificaram-se, ainda, melhorias nos níveis de PGE2 no líquido sinovial (Frisbie et al., 2009 citado por Frisbie & Stewart, 2011), com retorno à anterior performance (Ferris et al., 2009 citado por Ribitsch et al., 2010) e melhorias na reparação inicial (primeiro mês) de lesões cartilaginosas profundas (Wilke et al., 2007 citado por Ribitsch et al., 2010).

No que diz respeito a lesões nos meniscos, existem evidências de que a aplicação de células estaminais tem efeitos benéficos no seu tratamento e regeneração. Estas aderem ao menisco (Murphy et al., 2003, Agung et al., 2006 citados por Frisbie & Stewart, 2011) e as de origem medular têm sido usadas com sucesso na colonização de enxertos acelulares de menisco, na síntese de matriz extracelular viável e na regeneração de transplante de menisco em modelos roedores (Izuta et al., 2005, Yamasaki et al., 2005, Yamasaki et al., 2008 citados por Frisbie & Stewart, 2011). Estudos recentes realizados em equinos



demonstraram resultados muito promissores na recuperação dos animais, mesmo a nível de performance, após a administração de células estaminais provenientes da medula óssea (Frisbie & Stewart, 2011).

Apesar destes resultados promissores, existem dúvidas sobre se a regeneração ocorrerá através das MSCs, se estas iniciam e apoiam as células locais na regeneração do tecido (Frisbie, 2005 citado por Ribitsch, 2010) ou se o sucesso se deve às propriedades anti-inflamatórias destas (Chen et al., 2008 citado por Ribitsch et al., 2010).

A imagiologia é uma poderosa ferramenta para determinar o nível de reparação dos tecidos sobretudo, na avaliação das articulações a artroscopia desempenha um lugar importante e mais recentemente, o mesmo se verifica em relação à R.M.

Os estudos biomecânicos e cinéticos, disponíveis para a avaliação do movimento e cargas de uma articulação, apresentam resultados frequentemente limitados por uma quantificação semiobjectiva, atribuindo um *score* relativo ao grau de claudicação (Frisbie et al., 2009 citado por Clegg & Pinchbeck, 2011).

## **8. Aplicação de terapias regenerativas celulares em lesões de tendões e ligamentos**

O estiramento exagerado e as lesões traumáticas dos ligamentos e tendões são comuns nos equinos. Contudo, a sua maior parte, é reparada naturalmente através de tecido cicatricial, o que faz aumentar em muito o risco de reincidência e diminuição da performance do animal (Alves et al., 2011). Nestas circunstâncias a medicina regenerativa oferece uma melhor perspectiva de restauração da estrutura e função normais (ou próximo do normal) do órgão lesionado, resultando uma recuperação com sucesso da atividade, sem o risco de reincidência. Este tipo de terapias combina os efeitos de uma fonte celular, o suporte de uma estrutura (matriz) e estímulos anabólicos para facilitar a reparação da lesão (Butler et al., 2008 citado por Alves et al., 2011).

Uma origem lógica de células regeneradoras do tecido tendinoso seria o próprio tendão, mais propriamente os tenócitos, contudo, a biópsia do tendão para recolha, preparação e propagação de células leva à formação de uma lesão secundária no local dador, o que a torna uma opção pouco viável. Além disso, as células provenientes de tendões dadores, durante a cultura, apresentam diferentes características em relação às células dos tendões recetores, o que compromete a sua eficácia quando implantadas (Goodman et al., 2004 citado por Alves et al., 2011).

Outras alternativas de fibroblastos diferenciados, incluem os provenientes de ligamentos e os dérmicos. Os primeiros são potencialmente mais vantajosos uma vez que são metabolicamente mais ativos, no entanto, possuem características celulares diferentes que podem não ser apropriadas para a reparação dos tendões (Alves et al., 2011).

As lesões tendinosas têm a vantagem de ser muito vascularizadas e, por isso, são capazes de dar suporte nutricional às células implantadas, mormente às MSCs. O estímulo anabólico é proporcionado por citocinas e por um ambiente mecânico, de grande importância e potencialmente estimulantes para a diferenciação das células no meio intratendinoso (Alves et al., 2011), isto é, proporciona a presença de fatores de crescimento no tecido lesionado e a ação de forças de tensão, necessárias para que ocorra a formação de um tecido tendinoso organizado (Chong et al., 2007, Richardson et al., 2007 citados por Ribitsch et al., 2010). Isto pode ser aumentado através da suspensão das MSCs em soluções ricas em fatores de crescimento como o sobrenadante da medula óssea (Smith et al., 2006 citado por Alves et al., 2011).

Após a lesão, o tendão não apresenta obstáculos à infiltração celular, mas as células envolvidas na síntese de tecido cicatricial são maioritariamente locais (Guest et al., 2010 citado por Alves et al., 2011). A maioria dos tecidos tem uma população pequena de células precursoras, específicas do tecido, que intervêm na reposição das células perdidas através de um *turnover* natural e participam na reparação do tecido lesionado. Evidências de multipotencialidade, foram observadas em células derivadas de tendões jovens. Contudo, nos tendões adultos, esta não é tão evidente como nas células derivadas da medula óssea (Bi et al., 2007, Salingcariboon et al., 2003 citados por Alves et al., 2011). Esta limitação pode explicar a pouca influência das células progenitoras do tendão adulto no processo de reparação natural, surgindo como resultado desta um tecido cicatricial inferior (Alves et al., 2011).

O objetivo do uso de células estaminais, consiste em formar um novo tecido tendinoso. A sua implantação provoca um aumento do número de células progenitoras no tendão, melhorando a possibilidade de regeneração (Fortier & Smith, 2008 citados por Mattos Carvalho et al., 2011). Além disso, ocorre uma diminuição da inflamação, graças às suas propriedades imunomoduladoras, o que ajuda na regeneração (Iyer & Rojas, 2008 citados por Mattos Carvalho et al., 2011). Esta pode ser atingida por via direta, através da diferenciação em fenótipos celulares específicos dos tecidos e da produção de componentes de matriz extracelular apropriada. Outra via, a indireta, é feita através de efeitos tróficos como a produção de proteínas bioativas como fatores de crescimento, fatores antiapoptóticos e agentes quimiotáticos (Rehman et al., 2004, Haynesworth et al., 1996, Sorrel et al., 2009 citados por Alves et al., 2011), indo ao encontro de estudos que revelam um papel anti-inflamatório das células estaminais implantadas, assente nas suas capacidades hipoinmunogénicas e de inibição da ativação dos linfócitos T e B e as células NK (Herrero & Pérez-Simón, 2010, Rene et al., 2008 citados por Alves et al., 2011). O preciso mecanismo através do qual isto acontece ainda não é bem conhecido, embora uma combinação desta atividade juntamente com um efeito antiapoptótico, um recrutamento adicional de células progenitoras locais, uma estimulação do crescimento vascular e a

libertação de fatores de crescimento, contribuam para a reparação tecidual (Guest et al., 2010, Nixon et al., 2008, Carvalho et al., 2011 citados por Alves et al., 2011). Não é conhecida qual destas ações ocorre após a implantação celular, embora a opinião recorrente seja a favor da importância das atividades parácrinas (Murphy et al., 2003 citado por Alves et al., 2011).

No que diz respeito à eficácia das MSCs com origem na medula óssea na reparação do tecido tendinoso, *in vitro*, estas são capazes de sintetizar uma matriz abundante e bem estruturada, quando numa cultura em sobrenadante coagulado de medula óssea. No entanto, a demonstração da diferenciação tenogénica (tenócitos), é mais problemática do que as restantes (osteogénica, adipogénica e condrogénica). Isto, em parte, sucede porque um estímulo tenogénico eficaz ainda não foi bem definido e porque poucos marcadores definitivos, fenotípicos de tenócitos foram identificados, tornando difícil verificar a diferenciação neste tipo de células. Os tenócitos, em cultura, têm uma morfologia fibroblástica que é semelhante às MSCs e, portanto, não podem ser identificados apenas com recurso à sua morfologia (Alves et al., 2011).

O colagénio tipo I é a principal proteína sintetizada pelos tenócitos mas esta não é exclusiva destas células e, por isso, também não é característica para a sua identificação. A síntese da glicoproteína COMP permite uma melhor discriminação mas também não é exclusiva do tendão, sendo necessário considerar um perfil de proteínas extracelulares da matriz para uma melhor discriminação entre os tecidos musculoesqueléticos, bem como a expressão de determinados fatores como o de transcrição escleraxis ou a proteína transmembranar tenomodulina que podem indicar uma linha tenocítica (Shukunami et al., 2006 citado por Alves et al., 2011).

Um número de células estaminais inferiores a  $1 \times 10^6$  é tido como insuficiente para a reparação do tendão (Pacini et al., 2007 citado por Ribitsch et al., 2010) e estas podem ser aplicadas suspensas em sobrenadante de medula óssea em citrato, que apresenta um efeito estimulante nas células injetadas (Smith & Webbon, 2005 citados por Ribitsch et al., 2010) ou em plasma autólogo, *Phosphate buffered saline* (PBS), soro autólogo ou fibrinogénio (Schnabel et al., 2009, Pacini et al., 2007, Crovace et al., 2007 citados por Ribitsch et al., 2010).

O momento de implantação das células estaminais desempenha um importante papel no sucesso do tratamento, sugerindo-se este procedimento até um a dois meses (máximo três meses) (Alves et al., 2011) após a lesão, quando existe um tecido de granulação capaz e antes que se verifique o domínio de fibrose (Smith & Webbon, 2005 citados por Ribitsch et al., 2010).

As MSCs de diferentes origens têm sido implantadas *in vivo* em vários estudos de modelos animais com resultados positivos, mostrando uma variada regeneração de tecido tipo tendão. Vários estudos em equinos referem melhorias na organização estrutural, redução na

inflamação, aumento da expressão de COMP (Nixon et al., 2008 citado por Ribitsch et al., 2010); melhorias nos parâmetros ecográficos de orientação de fibras e ecogenicidade (Leppanen et al., 2009 citado por Ribitsch et al., 2010); síntese de matriz mais semelhante à do tendão normal, maior elasticidade, menor área transversal, melhorias na celularidade, preenchimento mais rápido da lesão e padrão de estriação longitudinal (Smith et al., 2009 citado por Ribitsch et al., 2010); retorno ao nível de performance anterior (Dahlgren, 2009, Pacini et al., 2007 citado por Ribitsch et al., 2010); redução da reincidência (Smith, 2008, Pacini et al., 2007 citado por Ribitsch et al., 2010), redução do colagénio tipo III (Nixon et al., 2008 citado por Mattos Carvalho et al., 2011); melhorias funcionais, morfológicas e parâmetros de composição, quando tratadas com MSCs medulares (Smith, 2010 citado por Gutierrez-Nibeyro, 2011).

No entanto, foi constatado num estudo com aplicação de MSCs expandidas, de origem medular, o potencial risco de mineralização, embora com uma baixa incidência (Fortier & Smith, 2008).

A comparação entre a aplicação de MSCs autólogas e alogénicas, realizada num recente estudo, permitiu verificar não existirem diferenças no número e distribuição de células autólogas e alogénicas, bem como na densidade de leucócitos no local. Não foram observados nem sinais externos nem histológicos de aumento da inflamação entre as duas aplicações, o que indica que as MSCs alogénicas não conduzem a uma resposta imune por parte do hospedeiro (Guest et al., 2008 citado por Ribitsch et al., 2010). O mesmo foi constatado com outros modelos animais, o que pode ser atribuído aos mecanismos de hipoinmunogenicidade e de prevenção da resposta das células T, por parte das células estaminais (Ribitsch et al., 2010).

Outros estudos, associam a implantação de MSCs a melhorias na resistência e na qualidade do tecido de reparação (determinadas pelo rácio colagénio tipo I / colagénio tipo III) (Hankemeier et al., 2007 citado por Alves et al., 2011).

As células implantadas muitas vezes exibiram uma morfologia fibroblástica, não sendo caracterizadas totalmente como tenócitos. Embora seja possível verificar a sobrevivência das células implantadas, ainda não se demonstrou que estas tenham sintetizado ou induzido a formação de uma matriz tipo tendinosa, bem como identificado os seus mecanismos. Também não é claro que a resposta destas células seja verdadeiramente regenerativa ou que algum benefício tenha advindo da sua influência no processo inflamatório que se segue à lesão (Alves et al., 2011). Muitos destes estudos são baseados em propriedades mecânicas e histológicas (Ribitsch et al., 2010), uma vez que a demonstração da diferenciação tenogénica não tem sido fácil de realizar, principalmente devido ao facto de não estar bem definido um estímulo tenogénico eficaz e de existirem ainda poucos marcadores fenotípicos de tenócitos adultos identificados. Mais recentemente, estudos têm registado esta diferenciação após suplementação dos meios de cultura com fatores de

crescimento apropriados (Violini et al., 2009, Park et al., 2010, Hoffmann et al., 2006 citados por Brehm et al., 2012), sendo também consensual a necessidade de estimulação mecânica das células ou tecido para que ocorra esta diferenciação (Juncosa-Melvin et al., 2007, Butler et al., 2008, Nirmalanandhan et al., 2008, Kuo and Tuan, 2008 citados por Brehm et al., 2012). Tem sido igualmente indicado que a expressão de proteínas como a proteína transmembranar tenomodulina, o fator de transcrição escleraxis (Shukunami et al., 2006 citado por Alves et al., 2011), a decorina ou a tenascin-C (Lovati et al., 2012) poderá indicar a diferenciação em linhas de tenócitos (Violini et al., 2009 citado por Alves et al., 2011), o que, juntamente com a utilização de um perfil de síntese de proteínas extracelulares como a COMP ou o colagénio tipo I permitirá uma melhor discriminação entre tecidos musculoesqueléticos (Alves et al., 2011). O aparecimento de mais marcadores de diferenciação tenocítica facilitará a avaliação da neogénese do tendão após aplicação das células estaminais.

Num estudo controlado de tratamento com MSCs versus tratamento salino, em tendinopatias de equinos, testes mecânicos, bioquímicos e de análises moleculares do tecido novo sintetizado, demonstraram que o tratamento com recurso a células estaminais apresentava aparentes melhorias nos resultados histológicos (Young et al., 2011 dados não publicados citados por Alves et al., 2011). O risco de reincidência da lesão nos cavalos de desporto tem-se revelado inferior após a implantação de MSCs (Alves et al., 2011).

Lesões tendinosas em cavalos tratados com MSCs derivadas da medula óssea retiveram uma porção das células no local da lesão, exibiram uma orientação correta das fibrilhas de colagénio e retomaram o exercício mais precocemente (Pacini et al., 2007 citado por Reed & Johnson, 2012).

Quando aplicadas ESCs em tendões de equinos, estudos revelaram uma sobrevivência e distribuição comparáveis às MSCs. A sua persistência no tempo foi, no entanto, superior quando aplicadas no TFDS, o que pode ser indicativo de proliferação ou manutenção do equilíbrio entre aquela e morte celular, tendo sido capazes de responder positivamente ao ambiente do tendão. Isto juntamente com o facto de ter ocorrido uma mínima infiltração leucocitária, sugere que estas células não são identificadas como estranhas ao sistema imunitário (Guest et al., 2010 citado por Alves et al., 2011). Não foram registadas formações de teratomas em estudos envolvendo o uso destas células em equinos, como o foram em estudos com outras espécies, o que naturalmente carece de um estudo mais aprofundado (Guest et al., 2010, Li et al., 2010 citados por Alves et al., 2011).

A análise ecográfica de tendões revelou não existirem grandes diferenças entre os parâmetros ecográficos dos membros que receberam o tratamento com MSCs ou com células nucleadas com origem no tecido adiposo e os animais controlo (Alves et al., 2011). No entanto, os valores histológicos indicaram que as lesões tratadas com as células estaminais estavam mais organizadas e tinham um tecido de reparação mais uniforme

quando comparado com os animais controle. Estes resultados demonstraram uma menor celularidade no tendão, menos infiltração por células inflamatórias, uma menor densidade fibroblástica, maior arranjo paralelo das fibras, maiores depósitos de matriz extracelular e maior expressão do colagénio tipo I (Nixon et al., 2008, Carvalho et al., 2011, Caplan, 1991 citados por Alves et al., 2011). Não se verificaram diferenças na avaliação imunohistoquímica da proliferação celular e na organização espacial do colagénio tipo I, embora houvesse uma redução da formação do colagénio tipo III nos tendões que receberam o tratamento celular (Nixon et al., 2008 citado por Alves et al., 2011). A expressão de COMP aumentou significativamente nos tendões onde foram implantadas as células nucleadas provenientes do tecido adiposo. A concentração desta proteína tem sido positivamente correlacionada com a resistência e rigidez nos tendões de animais jovens, o que pode indicar que a mesma esteja relacionada com a organização da matriz tendinosa e com a arquitetura do tendão e, conseqüentemente, com a regeneração deste tecido (Smith et al., 2002, Nixon et al., 2008 citados por Alves et al., 2011).

A utilização de aspirados de medula óssea constitui uma técnica mais rápida de aplicação destas células, baseando-se a sua eficácia em substâncias bioativas na fração não nucleada como fatores de crescimento produzidos por células ou plaquetas ou no potencial de um número reduzido de MSCs e outras células (Fortier & Travis, 2011, Vidal et al., 2007 citados por Alves et al., 2011). Aparentemente, este concentrado mostrou melhorias na deposição de certas proteínas extracelulares como colagénio tipo I e COMP e a redução de colagénio tipo III, indicador de tecido cicatricial. Esta resposta foi semelhante à demonstrada na implantação de MSCs após cultura, embora se registasse maior número de células inflamatórias no tecido (Crovace et al., 2010 citado por Alves et al., 2011).

Quanto ao uso de MSCs derivadas de tendão, estudos da sua aplicação demonstraram, embora em reduzido número, uma organização da matriz extracelular dos tendões tratados com MSCs mais próxima do tendão normal, quando comparado com os animais controle. Contudo, não houve diferenças na expressão de colagénio tipo I, III ou COMP entre ambos (Alves et al., 2011).

*In vivo*, as duas melhores formas de avaliar o sucesso do tratamento de uma lesão num tendão ou ligamento são a percentagem de retorno ao nível de atividade anterior e a taxa de recidiva do animal, após o retorno total à sua atividade. O exame ecográfico pode ser usado semiquantitativamente na medição da secção transversal das áreas de tendão e da lesão, verificação da ecogenicidade e linearidade do padrão das fibras. Todavia, estas medições estão frequentemente associadas a alguma subjetividade. O desenvolvimento da R.M trouxe vantagens para o acompanhamento clínico dos animais sujeitos a terapias celulares e a sua realização em estação é vantajosa evitando-se a anestesia geral. Mais recentemente verificou-se o desenvolvimento de uma abordagem biomecânica, *in vivo*, que permite

identificar a resposta dos tendões às terapias (Lacitignola et al., 2008, Burk & Brehm, 2011, Smith, 2008, Milner et al., 2011, Dakin et al., 2011 citados por Clegg & Pinchbeck, 2011).

## **9. Aplicação de terapias regenerativas celulares na reparação óssea**

A resolução de problemas ortopédicos em grandes animais pode ser dificultada devido à perda de tecido, incapacidade de reparação eficiente, elevado *stress* causado por cargas e infecção (Richardson, 2009 citado por Milner et al., 2011).

Os avanços no desenvolvimento de técnicas que proporcionem esta reparação têm levado ao surgimento de opções como, por exemplo, enxertos autólogos de osso (von Rechenberg & Auer, 2006 citado por Milner et al., 2011) ou ao crescente interesse na aplicação de células estaminais neste tecido. Outra das abordagens utilizadas baseia-se no uso de estruturas (tipo matriz) que são implantadas de modo a preencher o local da fratura ou na utilização de fatores que proporcionam estímulos osteogénicos, como é o caso de fatores da família BMPs (Bruder & Fox, 1999 citados por Ribitsch et al., 2010).

Os referidos enxertos são a técnica de utilização mais recorrente contendo células osteogénicas e matriz óssea (Deckers et al., 2002 citado por Milner et al., 2011). No entanto, pensa-se que grande parte das células neles presentes, seja perdida durante o procedimento (Jackson et al., 2000 citado por Milner et al., 2011). O enxerto tem como objetivos induzir a formação óssea e fornecer um suporte físico, uma estrutura, para o crescimento de novo tecido ósseo (Jackson et al., 2000, Kraus & Kirker, 2006 citados por Milner et al., 2011). As terapias celulares podem envolver a aplicação de medula óssea não fracionada, a aplicação de MSCs expandidas em cultura, MSCs diferenciadas na linha osteoblástica ou condrogénica ou a implantação de células geneticamente alteradas (Bruder & Fox, 1999 citados por Ribitsch et al., 2010).

Após uma fratura, os mecanismos despoletados para a reparação do tecido, são análogos àqueles que atuam durante o desenvolvimento e formação de osso nas fases iniciais da vida (osteogénese). A maior diferença reside no facto de se verificar uma resposta inflamatória e subsequente aumento do suprimento sanguíneo, que precedem a reparação da fratura (Milner et al., 2011).

As MSCs cujas capacidades osteogénicas são conhecidas, podem ser recrutadas para um local de fratura óssea a partir da medula óssea ou de osteoprogenitores do perióstio ou endóstio. MSCs provenientes da medula óssea e de populações circulantes de monócitos, têm sido igualmente estudadas para aplicação em terapia celular na reparação óssea. Após os estímulos quimiotáticos apropriados, as células estaminais localizam-se nos locais lesionados e contribuem para os mecanismos de reparação. A hipóxia e a disrupção vascular no local de fratura, são também estimulantes adicionais para a diferenciação

celular e regeneração óssea (Milner et al., 2011). Estas células proliferam e diferenciam-se em osteoblastos, condroblastos e fibroblastos dependendo do ambiente local da fratura (Carter et al., 1998 citado por Ribitsch et al, 2010), dando-se a formação de uma nova matriz extracelular que compreende osteoides e cartilagem, a qual sofre ossificação endocondral e formação óssea até ao preenchimento do espaço da fratura (Kraus & Kirker-Head, 2006 citados por Ribitsch et al, 2010).

O processo de reparação óssea e a capacidade de sobrevivência das células estaminais está dependente de fatores como a estabilidade da fratura, vascularização, expressão de fatores de crescimento e outros fatores celulares (Milner et al., 2011; Ribitsch et al., 2010). O ambiente inflamatório de uma fratura constitui um desafio às células osteoprogenitoras, cuja resposta na reparação beneficiará de estratégias clínicas que minimizem a inflamação no local e apoiem a rápida neovascularização (Milner et al., 2011). Criar ou manter um ambiente mecânico propício para a reparação óssea pode revelar-se, por vezes, uma tarefa complicada, sobretudo, em animais de grande porte como os equinos.

A densidade deste tipo de células nos mais importantes tecidos de origem é baixa. A expansão até níveis clinicamente viáveis (aproximadamente  $1 \times 10^7$  células) é normalmente realizada antes da sua implantação. No entanto, a retenção de células no local a intervencionar pode ser comprometida se não for suportada por um veículo ou estrutura eficazes (Milner et al., 2011).

Tem-se verificado que as técnicas em torno da atividade das MSCs envolvem a proteção e aplicação destas células no local da lesão, o uso de células geneticamente modificadas que expressam fatores osteogénicos e o uso de materiais/moléculas que recrutem e modulem a atividade das células estaminais residentes no local de fratura (Milner et al., 2011).

Recentemente têm sido efetuados vários estudos em diferentes modelos animais. Destes têm surgido resultados animadores com indução de formação de osso vascularizado, formação óssea substancial na interface entre o tecido do hospedeiro e implante (Kadiyala et al., 1997, Bruder et al., 1998 citado por Ribitsch, 2010), aumento do volume ósseo, formação de osso trabecular com marcada atividade osteoblastica e produção osteoide (Richards et al., 1999 citado por Ribitsch et al., 2010), aumento da formação óssea e maior rapidez de reparação na presença de MSCs (Kon et al., 2000 citado por Ribitsch et al., 2010), aumento da densidade óssea e parâmetros histológicos (McDuffee, 2009 citado por Ribitsch et al., 2010).

A utilização desta terapia regenerativa celular na reparação óssea é interessante mas, à parte da sua utilização como complemento de enxertos, esta abordagem, em grandes animais, não tem revelado grandes progressos, devido ao caráter urgente das situações clínicas como a fratura. No entanto, é importante a continuação dos estudos neste sentido já que estas terapias celulares, em alguma fase, permitirão um opção terapêutica adicional na ortopedia equina (Milner et al., 2011).



## 10. Atualidade das terapias regenerativas celulares

Hoje em dia, o médico veterinário de equinos tem à sua disponibilidade alguns laboratórios que prestam serviços relativos ao desenvolvimento e aplicação de terapias celulares.

Apesar de, neste momento, a sua eficácia clínica não ser muito sustentada, existe um crescente interesse neste tipo de terapia e na continuidade da sua investigação clínica, apoiadas em algumas evidências positivas e na ausência de efeitos adversos associados ao uso destes tratamentos (Clegg & Pinchbeck, 2011). Estas terapias biológicas têm ainda como vantagem o facto de não estarem sujeitas ao controlo de *doping* e restrições relacionadas com a administração de fármacos em animais em competição (Gutierrez-Nibeyro, 2011).

Presentemente, a maioria dos clínicos recorrem aos produtos autólogos mas existem resultados científicos que sugerem que as ESCs e MSCs derivadas de medula óssea ou placenta alogénicas também podem ser usadas, sem que se verifique o desencadear de uma resposta imunitária por parte do hospedeiro (Guest et al., 2008, Guest et al., 2010 citados por Gutierrez-Nibeyro, 2011) ou uma grande diferença nesta relativamente aos dois produtos autólogo e alogénico (Carrade et al., 2011 citado por Brehm et al., 2012). Esta abordagem permitirá uma aplicação mais rápida, com utilização de recursos em bancos de tecidos. No entanto, estes produtos têm um potencial associado de aumento do risco de transmissão de doenças entre pacientes. Recentemente, os estudos em desenvolvimento vão no sentido de melhorar a aplicação destas terapias regenerativas e obter evidências claras do seu uso. Por exemplo, têm surgido estudos em torno da eventual necessidade de existir um controlo na sinalização molecular no momento de aplicação das células estaminais, que permita guiá-las na regeneração, manutenção e reparação do tecido. Estas poderão não ser capazes, por si só, de se diferenciar no fenótipo celular apropriado e o local da lesão poderá não produzir os sinais corretos (Ahmad et al., 2012).

O sucesso destas terapias celulares poderá passar pelo entendimento destas questões, bem como, da possível necessidade de se fazer a estimulação mecânica para aumentar a expressão do colagénio ou do tipo de estrutura base, de suporte, para aplicação das células estaminais (Ahmad et al., 2012). Estas podem ser aplicadas diretamente ou em estruturas desenvolvidas para tal, que têm até agora demonstrado permitir melhorias na regeneração dos tecidos.

O desenvolvimento de auxiliares da terapia como a sinalização molecular (estimulação parácrina), estimulação mecânica e estruturas de suporte das células, podem contribuir para o seu potencial (Ahmad, 2012; Nixon, 2012).

Uma estrutura tridimensional é essencial no suporte temporário das MSCs para facilitar a aderência, migração, proliferação e diferenciação, mimetizando o ambiente natural das células e permitindo organizar-se num novo tecido (Noth et al., 2010, Spencer et al., 2011

citados por Seo et al., 2012). Várias estruturas têm sido testadas, quer compostas por biomateriais sintéticos, quer por materiais naturais como gelatinas, colagénio, fibrina, cerâmicas, entre outros. A estrutura ideal para aplicações ortopédicas deverá ser biodegradável, muito porosa, capaz de suportar forças mecânicas e facilitar a proliferação e diferenciação celular (Seo et al., 2012). Tem sido verificado que as MSCs entram em senescência e começam a perder as suas características durante a cultura *in vitro* (Bonab et al., 2006). Se forem necessários grandes números destas células para a terapia, esta será dispendiosa e demorada. Por esta razão, o uso de menores números de MSCs e um menor período de expansão poderá facilitar as aplicações terapêuticas (Seo et al., 2012)

A combinação de células estaminais com colagénio, fibrina ou PRP e o efeito local de forças mecânicas, estimula o ambiente natural de reparação dos tecidos e pode proporcionar maior robustez na reparação. O potencial para melhores resultados pode residir ainda na dose de células estaminais a aplicar.

Um número cada vez superior de estudos descrevem melhorias dos resultados, o que se tem verificado após o uso de uma combinação de células estaminais com genes integrados (como, por exemplo, de fatores de crescimento) cujo objetivo é aumentar as funções dessas células na regeneração de tecidos. A introdução destes genes é feita a partir de vetores virais. O controlo das ligações colagénias e a expressão abundante do colagénio tipo III e tipo V após lesão são alvos principais na tentativa de melhoria da reparação de tendões, por meio de terapias celulares e genes (Nixon, 2012).

## **II. Estudo retrospectivo de dois casos clínicos com aplicação de MSCs**

### **a) Caso clínico nº1**

#### **História clínica**

Égua de 8 anos de idade, raça BWP, atleta de saltos de obstáculos. Apresentava inflamação do membro anterior esquerdo (MAE). No exame físico não foram detetadas alterações com significado clínico dignas de registo. Apenas na avaliação do aparelho locomotor, durante o exame estático, se verificou uma inflamação na região dos tendões flexores, com dor à palpação profunda. Quanto ao exame dinâmico, não se observou uma claudicação evidente (0/5 a 1/5 das diretrizes da AAEP) (Anexo II).

No exame ecográfico do membro afetado, foi possível detetar uma alteração no tendão flexor digital profundo (TFDP) na zona 2A do MAE, apresentando-se mais hipoeecogénica, diagnosticando-se uma tendinite aguda nesta zona.

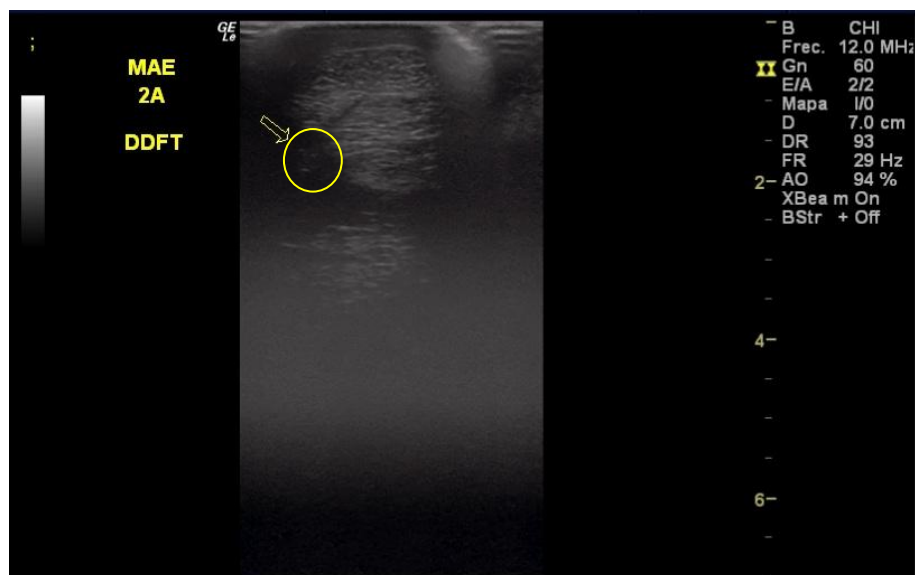


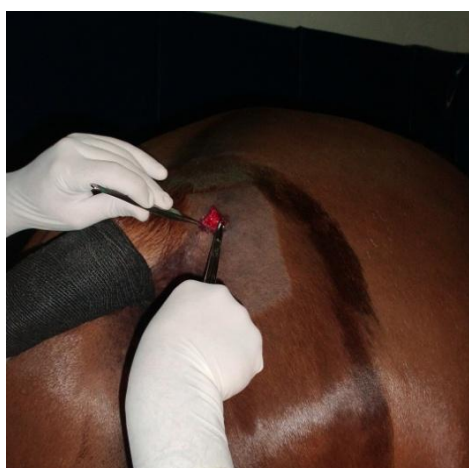
Figura 4: Imagem ecográfica transversal da lesão do TFDP do MAE na zona 2A, realizada na consulta de diagnóstico.

Seta: Delimitação da lesão

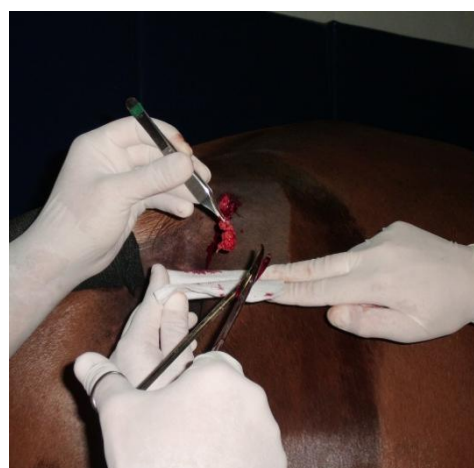
(gentilmente cedida por *Hippiatrica*)

#### Tratamento:

Não foi administrado qualquer tipo de fármaco anti-inflamatório, recomendando-se a aplicação de duches frios, caminhar diariamente à mão e aplicação de ligaduras de descanso. Foi agendada uma cirurgia tendo em vista a recolha de tecido adiposo para obtenção de MSCs (Figura nº5). Esta teve lugar na clínica, uma semana depois da consulta (Anexo III).



(a)



(b)

Figura 5: (a) e (b) Recolha de tecido adiposo  
(imagens gentilmente cedidas por *Hippiatrica*)

A recolha de tecido adiposo realizou-se de acordo com o protocolo do laboratório da *FAT STEM*. A amostra foi armazenada em tubo estéril presente no kit do laboratório (*Plate-Stem®*) e foram recolhidos 200 ml de sangue periférico, por meio de cateterização da veia jugular, para uma bolsa do mesmo kit (Anexo VIII) e apropriada para o efeito (Figura nº6 e

Figura nº7). O envio das amostras foi feito segundo as instruções do laboratório (Anexo IV) e foi aconselhada a continuação da terapia e manejo anteriormente instituídos.



Figura 6: Material biológico recolhido – tecido adiposo  
(imagem gentilmente cedida por *Hippiatrica*)



Figura 7: Material biológico recolhido – 200 ml de sangue periférico  
(imagem gentilmente cedida por *Hippiatrica*)

Cerca de 15 dias após a recolha, as células estaminais, isoladas e expandidas laboratorialmente, foram remetidas para a clínica em dois tubos de 1 ml.

Com o animal em estação e sedado (associação de 0.5 mg/kg de xilazina - Xilagesic 20%, Calier® e 0.01mg/kg de butorfanol - Botomidor, Richter pharma®), a região metacarpal palmar foi preparada assepticamente. Eventualmente, para maior segurança do clínico, facilidade na realização do procedimento e conforto do animal, poder-se-á efetuar a anestesia local da região de modo a dessensibilizar a pele e tecido subcutâneo. Com recurso a uma agulha hipodérmica de 19 a 21G x 1 ½” polegadas (40mm), os 2 ml de suspensão contendo as  $30 \times 10^6$  células foram aplicados intralesionalmente, mediante visualização ecográfica (aplicação ecoguiada).

A aplicação das MSCs pode ser realizada numa única injeção ou em mais do que um local de injeção, dependendo da extensão da lesão.

Após a intervenção, foi colocado um algodão e uma ligadura coesiva para proteção do local e recomendada a permanência de ligaduras de descanso durante os dois primeiros dias pós-intervenção. Aconselhou-se o repouso na boxe durante 15 dias.

Acompanhamento do caso:

O primeiro controlo ecográfico foi feito sete dias após a aplicação das células estaminais e, na secção transversal do tendão, verificou-se uma redução da ecogenicidade na superfície medial do TFDP (Figura nº8). Longitudinalmente, observou-se uma diminuição da ecogenicidade com alguma desorganização das fibras tendinosas (Figura nº9).

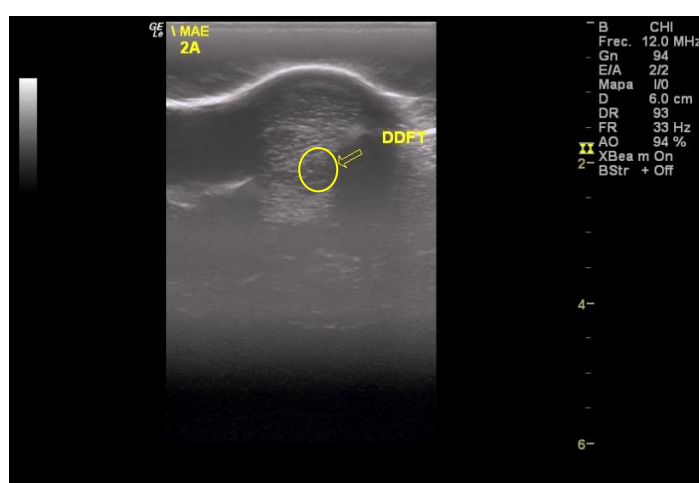


Figura 8: Imagem ecográfica transversal do TFDP do MAE na zona 2A – 1º controlo realizado 7 dias após aplicação da terapia.

Seta: Delimitação da lesão 7 dias após tratamento  
(gentilmente cedida por *Hippiatrica*)

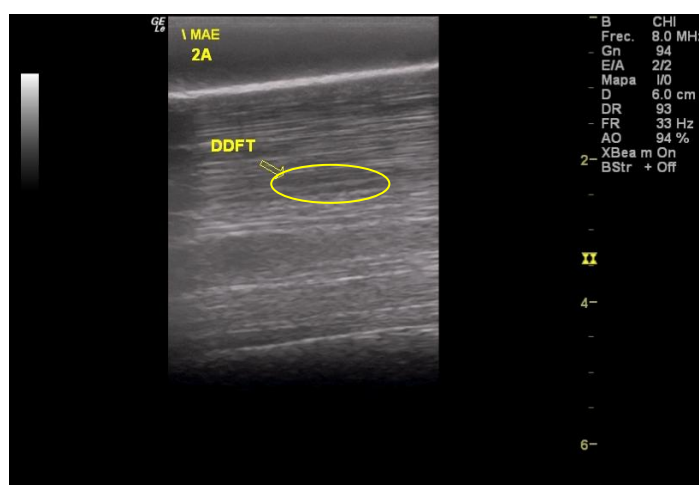


Figura 9: Imagem ecográfica longitudinal do TFDP na zona 2A – 1º controlo realizado 7 dias após aplicação da terapia.

Seta: Delimitação longitudinal da lesão 7 dias após tratamento  
(gentilmente cedida por *Hippiatrica*)

Uma vez concluído o tempo recomendado de repouso na boxe, iniciou-se o plano de reabilitação baseado num formato geral (Anexo V).

No segundo controlo, realizado cerca de 15 dias após o primeiro, observou-se no local da lesão, uma ligeira hipoecogenicidade, contudo menor que no controlo anterior e um preenchimento e maior reorganização das fibras tendinosas, ou seja, verificaram-se melhorias relativamente à avaliação anterior (Figura nº10 e Figura nº11).

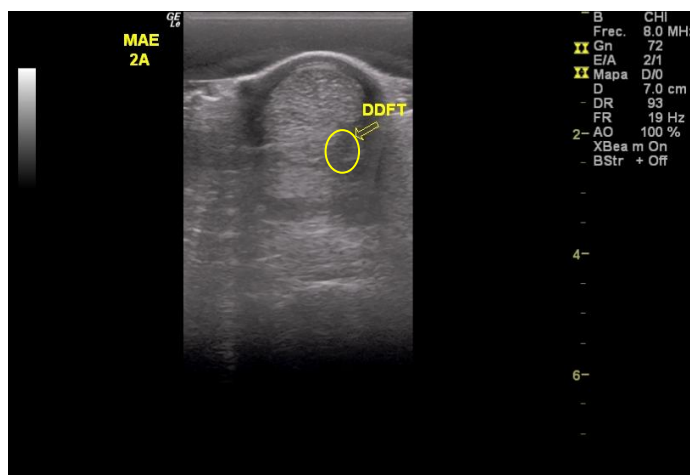


Figura 11: Imagem ecográfica transversal do TFDP na zona 2A – 2º controlo realizado 22 dias após a aplicação da terapia.

Seta: Delimitação da lesão 22 dias após tratamento  
(gentilmente cedida por *Hippiatrica*)

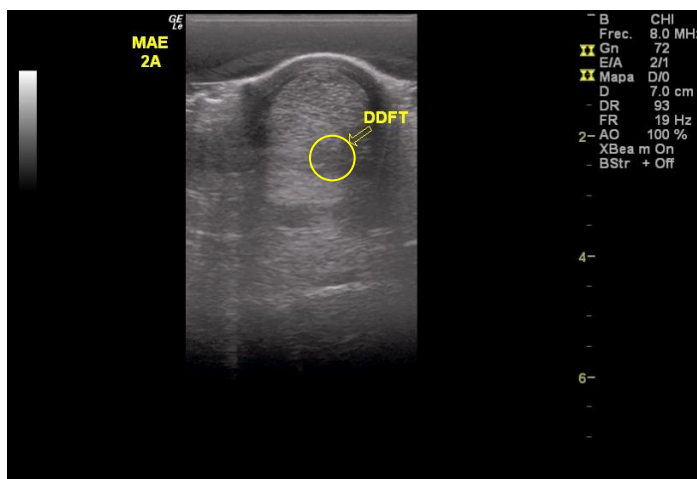


Figura 10: Imagem ecográfica transversal do TFDP na zona 2A – 2º controlo realizado 22 dias após a aplicação da terapia.

Seta: Delimitação da lesão 22 dias após tratamento  
(gentilmente cedida por *Hippiatrica*)

Embora não tivessem sido realizados mais controlos ecográficos do membro e uma vez concluído o plano de reabilitação, a égua encontra-se recuperada em termos clínicos, tendo retornado aos mesmos níveis competitivos.

## b) Caso clínico nº2

### História clínica:

Garanhão de 11 anos de idade, raça *Holstein*, competindo a alto nível em saltos de obstáculos, cujo estímulo iatrotrópico consistiu na claudicação do membro anterior direito (MAD) e do membro posterior direito (MPD). De acordo com o proprietário, a claudicação em ambos os membros era recorrente, tendo já sido efetuados tratamentos intra-articulares com aplicação de corticosteroides na articulação interfalângica distal (IFD) do MAD e dos compartimentos lateral e medial da articulação femorotibial (FT) do MPD, uma das articulações constituintes da articulação femorotibiopatelar (FTP).

Por informação do proprietário, o último tratamento já não obteve qualquer resposta por parte do animal.

Na consulta, o exame físico não apresentava alterações com significado clínico dignas de registo e durante a avaliação do aparelho locomotor, no exame estático não se verificaram alterações. Quanto ao exame dinâmico, verificou-se uma claudicação de 2/5 (diretrizes da AAEP) do MAD (Anexo II). Nos testes de flexão observou-se uma resposta positiva relativamente à IFD do MAD e FTP do MPD. Posto isto, decidiu-se realizar bloqueios perineurais com recurso a mepivacaína (*Braun®*) para identificação da ou das regiões afetadas dos membros, registando-se, como dado relevante, uma resposta positiva de 100% no bloqueio abaxial do MAD.

Para efeitos de diagnóstico, foi feito um estudo radiológico da extremidade distal do MAD tendo-se verificado, na projeção DP 45°, o aumento dos canais vasculares do osso navicular. No estudo radiológico da articulação FTP do MPD, que incluiu as projeções LM e caudo-cranial, não apresentavam alterações com significado clínico dignas de registo (Figura nº12).

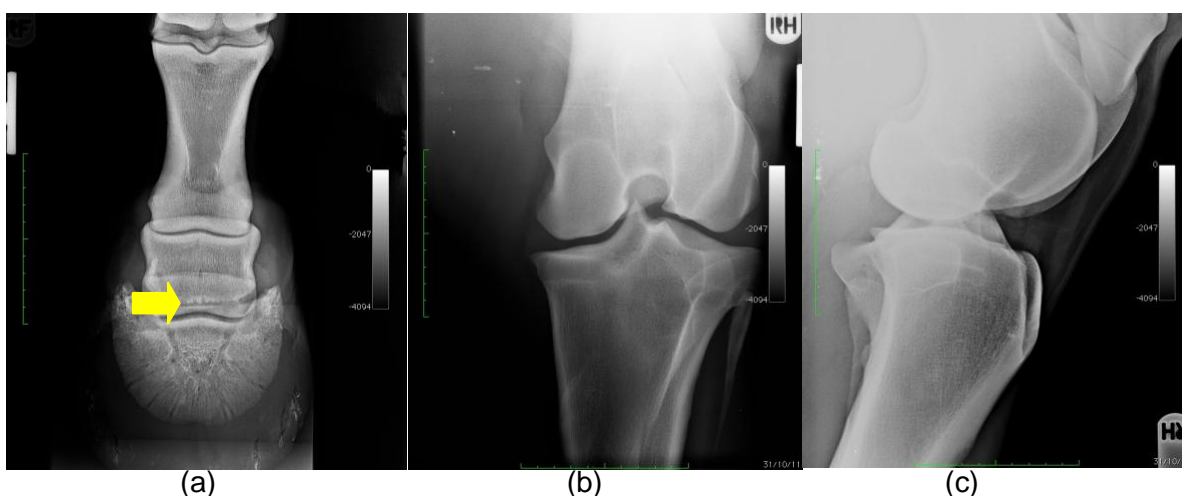


Figura 12: Imagens radiográficas – (a) Projeção DP 45° da extremidade distal do MAD; (b) Projeção caudo-cranial; (c) Projeção LM da articulação FTP.

Seta: Canais vasculares do osso navicular  
(gentilmente cedidas por *Hippiatrica*)



Tendo em conta os resultados, não foi possível o diagnóstico definitivo relativamente à articulação IFD do MAD, optando-se pela realização de uma R.M (Figuras nº13 e nº14). No relatório da avaliação desta articulação estava descrita uma erosão da superfície medial da cartilagem articular, tendo sido diagnosticado artropatia da articulação IFD do MAD com erosão da cartilagem (Anexo VI).



Figura 13: Imagens de R.M da extremidade distal do MAD  
(gentilmente cedidas por *Hippiatrica*)





Figura 14: Imagens de R.M da extremidade distal do MAD (continuação).

Setas: Delimitação da lesão medial da cartilagem articular

(gentilmente cedidas por *Hippiatrica*)

#### Tratamento:

Uma vez obtido este diagnóstico, o proprietário foi aconselhado pelo clínico a optar pelo tratamento da articulação com recurso à aplicação de MSCs. Foi feita a recolha de tecido adiposo (Anexo III) segundo as indicações do laboratório da *FAT STEM (Chondro-Stem®)* (Anexo VII), seguindo-se a colheita de sangue periférico, tudo com recurso ao kit disponibilizado pelo laboratório, sendo depois devidamente enviadas para o mesmo (Anexo VIII).

Cerca de 15 dias após a recolha de tecido adiposo, o resultado do isolamento e posterior expansão foi enviado para o clínico, no interior de dois tubos contendo 1 ml cada (Figura nº15).



Figura 15: Tubos enviados pela *FAT STEM* contendo células estaminais

(gentilmente cedido por *Hippiatrica*)

Uma vez sedado o animal (associação de 0.5 mg/kg de xilazina - Xilagesic 20%, Calier® e 0.01mg/kg de butorfanol - Botomidor, Richter pharma®) e estando este em estação, a

articulação IFD foi abordada ao nível da face dorsal do membro, preparando-se assepticamente esta região. Eventualmente, para maior segurança do clínico, facilidade na realização do procedimento e conforto do animal, poder-se-á administrar uma pequena quantidade de anestésico local de modo a dessensibilizar a pele e tecido subcutâneo da região. O ponto de injeção localizou-se cerca de 1cm acima do bordo coronário e 1,5cm lateral à linha média, tendo sido introduzida uma agulha de 20G x 1 ½" polegadas (40mm) em posição, aproximadamente, vertical e dirigida distal e medialmente em relação ao centro do casco (ângulo de 90º relativamente à superfície solar do membro). Após a certeza de entrada no espaço articular (saída de líquido sinovial e/ou não resistência na injeção) foram aplicados os 2 ml de suspensão contendo as células estaminais, em número superior a 30x10<sup>6</sup>. Posteriormente, o local de injeção foi protegido com algodão e ligadura coesiva, procedendo-se à realização de uma "bota" protetora da extremidade distal do MAD. Uma vez concluído o período de 15 dias de repouso na boxe, instituiu-se um plano de reabilitação tendo por base o plano existente na clínica para a realização desta.

Acompanhamento do caso:

Neste caso não foram realizados controlos imagiológicos pós-intervenção, uma vez que o animal passou a residir noutro país. No entanto, cinco meses após o tratamento intra-articular, o animal foi avaliado em termos clínicos e encontrava-se recuperado, isto é, sem sinais de claudicação. De acordo com o cavaleiro, o animal retomou a performance desportiva anterior à lesão, já tendo entrado em competições.

## **Discussão**

O objetivo do uso deste tipo de terapias consiste em aumentar a regeneração de tecidos lesionados ou doentes, que têm uma capacidade natural regenerativa fraca como tendões, ligamentos, meniscos e cartilagens (Stocum, 2006 citado por Gutierrez-Nibeyro, 2011). A sua aplicação nos equinos, em especial, os de desporto, tem como propósito a diminuição da taxa de recidiva de lesões (principalmente em tendões e ligamentos) e, consequentemente, do tempo de confinamento prescrito (Pacini et al., 2007, Godwin et al., 2012 citados por Reed & Johnson, 2012).

Mais concretamente, a terapia com recurso às células estaminais tem-se revelado uma técnica promissora no tratamento de certas doenças degenerativas ou traumáticas aproveitando a plasticidade e capacidade de diferenciação demonstrada por estas células (Marfe et al., 2012). Para esta afirmação têm contribuído resultados de estudos levados a cabo em equinos, já anteriormente citados neste trabalho.

Os dois casos clínicos apresentados dizem respeito a animais que competem ao mais alto nível, cujas lesões atingiram o aparelho musculoesquelético, frequentemente afetado e principal alvo de aplicação deste tipo de terapias nestes animais. Os diagnósticos indicados, tendinite do TFDP do MAE e artropatia da articulação IFD do MAD, são comuns em cavalos de saltos de obstáculos, como citado por Dysson (2000), embora o primeiro se verifique com maior frequência no TDFS.

O clínico optou por efetuar a recolha de tecido adiposo localizado ao nível da base da cauda do animal, como origem de MSCs. Esta opção, para além de ter em conta as condições relativas ao laboratório com o qual se trabalhou (*FAT STEM*), foi feita também tendo em consideração as já referidas vantagens, como a abundância deste tecido, a obtenção relativamente fácil, segura e eficaz do tecido.

Uma vez recolhida a amostra e já em laboratório, foi feita a cultura e expansão de MSCs com o objetivo de se atingirem números de células estaminais favoráveis, não havendo, assim, a implantação de um produto heterogéneo como é o caso da fração de estroma de tecido adiposo decorrente de digestão tecidular. Com efeito, isto poderia provocar distúrbios na reparação dos tecidos, devido a uma resposta imunitária (Mattos Carvalho et al, 2011). Apesar de constituir um método invasivo de recolha, este revelou-se de fácil execução e sem grandes riscos quer para o clínico quer para o animal. Realizado com o animal em estação, sobre efeito de sedação, não se registaram problemas durante todo o procedimento ou posteriormente a este, não se tendo verificado qualquer sinal de infeção em ambos os casos clínicos.

Uma vez feita a recolha asséptica de 20 a 30g de tecido adiposo e de 200 ml de sangue periférico a partir da veia jugular, as amostras foram acondicionadas e enviadas para o laboratório de acordo com as indicações. Neste foi feito o seu processamento, nomeadamente, a digestão do tecido e posterior cultura e expansão das células estaminais, tendo sido obtida uma concentração de  $30 \times 10^6$  células. Este valor supera, assim, o intervalo de  $5 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$  referido por vários autores (Schnabel et al., 2009, Nixon et al., 2008, Pacini et al., 2007, Smith, 2008 citados por Gutierrez-Nibeyro, 2011; Dellling et al., 2012), que podem ser tomados como valores mínimos a aplicar. O referido valor de dose celular foi garantido pelo laboratório. No entanto, não é possível descortinar se terá sido o ideal em termos de resultados, isto porque não foram feitos controlos que pudessem permitir uma posterior avaliação mais fundamentada e porque as duas aplicações dizem respeito a lesões distintas em áreas intervencionadas diferentes, o que torna difícil estabelecer um ponto de comparação.

A aplicação da terapia foi realizada duas semanas após a recolha das amostras, ou seja, sensivelmente três semanas após o diagnóstico, o que significa que estariam reunidas as condições para a receção das células, isto é, a fase de inflamação aguda encontrar-se-ia mais atenuada, verificar-se-ia a existência de um tecido de granulação muito vascularizado,

ideal como suporte nutricional e a ausência de um tecido fibroso exuberante (Han & Kweon, 2011, Hu et al., 2007 citados por Peroni & Borjesson, 2011; Godwin et al. 2011).

As células estaminais expandidas encontravam-se diluídas numa suspensão - PRP autólogo - rica em plaquetas e fatores de crescimento, com o objetivo de promover um efeito anabólico, uma regeneração dos tecidos e o bom desempenho das células. A aplicação das MSCs em matrizes biológicas como fibrina, colagénio ou PRP, geralmente, melhora a retenção das células no local lesionado e pode proporcionar uma mais eficaz reparação dos tecidos. O uso de PRP, sobrenadante de medula óssea e/ou soro equino na suspensão celular, pode desempenhar um papel importante na reparação tecidular (Pacini et al., 2007, Godwin et al., 2012, Torriceli et al., 2011 citados por Reed & Johnson, 2012).

A aplicação das suspensões foi, no primeiro caso clínico, direta na lesão tendinosa e, no segundo caso clínico, direta por via intra-articular, recorrendo-se no primeiro à ecografia, como guia. Estes procedimentos não ofereceram grandes dificuldades de execução, tendo sido relativamente rápidos. Por outro lado, não exigiram uma utilização de grandes meios em termos materiais, por parte da clínica. A administração intralesional das células estaminais pode aumentar a reparação intrínseca, minimizar a inflamação inicial, formação de tecido cicatricial e reduzir a probabilidade de recidiva (Schnabel et al., 2009, Fortier et al., 2010, Nixon et al., 2008, Crovace et al., 2010, Pacini et al., 2007, Smith, 2008 citados por Gutierrez-Nibeyro, 2011).

Em termos clínicos, verificou-se uma significativa melhoria em ambos os animais, tendo-se constatado o retorno à sua anterior performance. No primeiro caso, o primeiro controlo por meio de ecografia, foi realizado sete dias após a aplicação da terapia tendo-se verificado melhorias nos parâmetros ecográficos do tendão, nomeadamente, a redução da área transversa hipoecogénica e a reorganização de fibras. No segundo controlo verificou-se a continuação destas melhorias. Contudo, em nenhum dos exames ecográficos foi efetuada a medição das áreas afetadas, o que teria sido vantajoso para a obtenção de resultados mais objetivos, embora, não seja muito forte a relação entre as dimensões das lesões na ecografia e o prognóstico (Genovese et al. 1997 citado por Godwin et al. 2011). Tal advém do facto de haver dificuldade na medição da região verdadeiramente hipoecogénica e no assumir que a lesão fica circunscrita apenas a esta região.

No segundo caso clínico, até à data, não foram realizados quaisquer controlos imagiológicos com recurso a ecografia, R.M ou por meio de artroscopia baseando-se a avaliação do tratamento no estado clínico do animal e na opinião do cavaleiro.

Não existe uma regra relativamente à altura em que devem ser realizados os controlos ecográficos, contudo, em alguns estudos têm sido referenciados como sendo úteis os controlos ecográficos aos 1, 3, 6, 9 e 12 meses após aplicação das células em lesões tendinosas (Ribitsch et al., 2010; Godwin et al, 2011). Em relação à avaliação das articulações, é possível recorrer ao exame ecográfico, à artroscopia ou à R.M dependendo

da articulação em questão e da disponibilidade de recursos. A artroscopia, apesar de possibilitar a visualização do interior da articulação e a evolução das zonas lesionadas, implica a anestesia geral do animal, com meios e custos elevados, constituindo um método invasivo para avaliação pós-aplicação das células estaminais.

Após a aplicação da terapia, não se verificou o desenvolvimento de inflamação como resposta do organismo à suspensão, nem a formação, até à data, de neoplasias nos locais de implantação (ex: sarcoma no tendão) (Tasso et al, 2009 citado por Mattos Carvalho et al., 2011).

As vantagens quanto ao uso desta terapia residem na melhoria da qualidade do tecido de reparação e na restauração da sua funcionalidade, o que, conseqüentemente, se traduzirá numa menor taxa de recidivas quando em comparação com os tratamentos convencionais. Nos equinos, a maior parte dos estudos clínicos relativos à aplicação da terapia com células estaminais, diz respeito ao tratamento de lesões nos tendões e ligamentos (Clegg and Pinchbeck, 2011) e nestes, têm sido referidas taxas de recidivas inferiores aquelas que se têm registado com tratamentos convencionais (Godwin et al, 2011).

Relativamente aos dois casos clínicos apresentados, sete meses após a terapia (tempo decorrido até ao término do estágio da autora), os dois referidos animais não registaram recidivas das lesões. Não obstante esta situação constituir um bom indicador para a aplicação destas terapias, é precipitado tirarem-se conclusões mais profundas a respeito da taxa de recidiva, já que estudos que a avaliaram fizeram-no com base num elevado número de animais acompanhados por mais de um ano (dois a três anos de acompanhamento em alguns estudos) (Pacini et al., 2007, Burk and Brehm, 2011 citados por Brehm et al., 2012; O'Meara et al., 2010; Godwin et al, 2011).

Os tratamentos convencionais possibilitam a redução de sintomas clínicos, não demonstrando vantagens na regeneração dos tecidos, sendo substituído o tecido normal por tecido fibroso, funcionalmente deficiente. Além disso e em regra, estes tratamentos exigem longos períodos de inatividade, programas de exercício controlado, terapias anti-inflamatórias, terapias intralesionais recorrentes e até mesmo outros métodos que envolvem cirurgias (McIlwraith et al., 2002 citado por Marfe et al., 2012). A perspectiva de se obter uma melhor recuperação dos tecidos, tem sido uma das principais razões para o desenvolvimento das terapias regenerativas como esta que foi aplicada nos casos clínicos anteriormente apresentados. No entanto, nesses casos não foi possível determinar a qualidade do tecido de reparação, devido à falta de dados ecográficos, R.M, artroscópicos (2º caso clínico), biomecânicos, histológicos, bioquímicos ou moleculares (Godwin et al. 2011).

Para além disso, não foi possível determinar o papel desempenhado pelas MSCs nestas duas aplicações. Com efeito, podem ter estimulado a secreção de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento com efeito parácrino ou autólogo, como a supressão do

sistema imunitário local, inibição de fibrose, apoptose, estimulação de mitose e recrutamento de células estaminais locais, ou podem ter induzido a diferenciação direta destas células no tecido a reparar (Caplan & Dennis, 2006 citados por McIlwraith et al, 2011; Dazzi and Horwood 2007, Tyndall et al. 2007, Karisson et al. 2008, Muller et al. 2008 citados por Godwin et al. 2011; Caplan & Dennis, 2006 citados por Hale et al. 2012). No entanto, este tem sido um problema transversal a outros estudos e base de trabalhos atuais.

O uso destas terapias permitiu um regresso dos cavalos às competições sem que se verificassem impedimentos relativos ao uso de fármacos reconhecidos como *doping*. As terapias biológicas têm esta vantagem dado que não são sujeitas à deteção de *doping* e restrições pertencentes à administração de agentes farmacêuticos (Gutierrez-Niebeyro, 2011).

Os casos clínicos anteriormente expostos, dizem respeito a animais que competem ao mais alto nível. Se por um lado estes animais estão sujeitos a um acompanhamento regular, por outro a disponibilidade por parte de proprietários e o facto de terem de cumprir calendários desportivos exigentes, dificultou a obtenção de resultados, sobretudo, dos exames de controlo.

A reparação das lesões musculoesqueléticas é em grande parte influenciada pelo maneio do animal durante a fase de reabilitação e, em particular, a forma como o retorno ao exercício é feito e monitorizado. É importante que o cavalo seja sujeito a um período de repouso na boxe, seguido de exercício controlado.

De acordo com um programa desenvolvido pelo clínico, ambos os casos foram sujeitos a repouso seguido de um exercício controlado, até retorno à competição. Este programa, baseado na experiência do clínico, é disponibilizado em anexo. Embora dependente da opinião do clínico e tendo em conta a disciplina desportiva e nível de competição do cavalo, este programa deve ser gradual e, sempre que possível, monitorizado e estratificado no contexto de ecografias/avaliações seriadas (Clegg & Pinchbeck, 2011).

## **Conclusão**

Hoje em dia, os médicos veterinários de equinos têm à sua disposição, várias opções de terapias celulares para o tratamento de lesões musculoesqueléticas em cavalos. Embora a investigação nesta área seja ainda limitada, a literatura corrente, vai no sentido de apoiar o uso destas terapias neste tipo de lesões (Gutierrez-Niebeyro, 2011). Esta literatura assenta, muitas vezes, em evidências clínicas de retorno dos cavalos à sua anterior performance. Com efeito, a aplicação destas terapias em tendões, ligamentos e articulações, comparativamente aos tratamentos habituais, têm originado resultados bastante

interessantes, sobretudo ao nível dos primeiros, com retorno ao trabalho por parte dos animais (Frisbie & Smith, 2010 citados por Hale et al., 2012).

Os trabalhos nesta área de equinos têm-se deparado com alguns problemas, nomeadamente, limitações relacionadas com a amostragem. Geralmente, esta é em número reduzido, dispendiosa e complexa de se realizar (Clegg & Pinchbeck, 2011).

Existe um número crescente de estudos de aplicação de células estaminais que, tal como no caso dos animais apresentados neste trabalho, se singem a casos clínicos de equinos que possuem proprietários, os quais têm fornecido dados interessantes e importantes relativos à abordagem e técnicas utilizadas, revelando dados sobre efeitos secundários como reações de rejeição ou formação de tumores. No entanto, em termos de estudos aleatórios, cegos e de controlo são pouco rigorosos (Clegg & Pinchbeck, 2011). A realização destes estudos transversais, muitas vezes envolve animais de diferentes disciplinas desportivas o que, provalvemente terá influência nas lesões apresentadas e na resposta ao tratamento mesmo que se aplique numa mesma lesão (Clegg & Pinchbeck, 2011).

Apesar de tudo, o potencial destas terapias celulares nas lesões ortopédicas equinas é grande, o que torna importante e apoia a continuação da investigação clínica (Clegg & Pinchbeck, 2011).

Com o estudo dos dois casos clínicos apresentados, verificamos que o uso de terapias regenerativas, nomeadamente, o uso de células estaminais poderá representar uma alternativa viável aos tratamentos convencionais. No entanto e apesar da recuperação dos animais, não é possível afirmar o absoluto êxito desta terapia, sobretudo no que se refere à ação das células aplicadas. Da mesma forma e dado que em ambos os casos foi utilizado o mesmo tecido origem, não é possível fazer-se a comparação entre diferentes tecidos origem ou indicar se o tecido adiposo é a fonte ideal de células estaminais. Estudos *in vitro* têm demonstrado superioridade das células com origem na medula óssea na regeneração dos tecidos mas, *in vivo*, estas diferenças não se têm registado e a facilidade da recolha de tecido adiposo representa uma vantagem para muitos médicos veterinários (Kisiday et al., 2008, Toupadakis et al., 2010, Vidal et al., 2008, Frisbie et al., 2009 citados por Gutierrez-Nibeyro, 2011).

Posto isto e tendo em conta a revisão bibliográfica feita, é possível concluir que há a necessidade de se realizarem mais estudos, de modo a obter mais evidências clínicas de que este tratamento será uma alternativa para o futuro. Muitas são as questões a responder, nomeadamente, qual a origem ideal de células estaminais, qual a correta concentração a utilizar, qual o mecanismo de ação das células estaminais nos tecidos, qual o melhor método de aplicação a usar ou até qual o momento ideal de aplicação do tratamento. Além disso, é necessário mais tempo de estudo e avaliação, bem como o uso de métodos biomecânicos e bioquímicos ou da expressão genética, para uma melhor avaliação desta terapia.

Para o desenvolvimento das terapias regenerativas, torna-se necessário continuar com a investigação, de modo a proporcionar aos médicos veterinários ferramentas mais eficazes para o tratamento das lesões.



## Bibliografia

1. Ahern, B.J., Schaer, T.P., Terkhorn, S.P., Jackson, K.V., Mason, N.J., Hankenson, K.D. (2011). Evaluation of equine peripheral blood apheresis product, bone marrow, and adipose tissue as sources of mesenchymal stem cells and their differentiation potential. *American Journal of Veterinary Research*, 72 (1), 127-133.
2. Ahmad, Z., Wardale, J., Brooks, R., Henson, F., Noorani, A., Rushton, N. (2012). Exploring the Application of Stem Cells in Tendon Repair and Regeneration. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopy and Related Surgery*, 28 (7), 1018-1029.
3. Alves, A.G.L., Stewart, A.A., Dudhia, J., Kasashima, Y., Goodship, A.E., Smith, R.K.W. (2011). Cell-based Therapies for Tendon and Ligament Injuries. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 315-333.
4. Berger, R.A., Weiss, A.P.C, (2004). Basic Pathology of the Hand, Wrist and Forearm: Tendon and Ligament. In *Hand Surgery*. (1<sup>st</sup> ed.). (Vol.1). USA: Lippincott Williams & Wilkins. Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.msdlatinamerica.com/ebooks/HandSurgery/sid125381.html>.
5. Borjesson, D.L., Peroni, J.F. (2011). The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 109-123.
6. Brama, P. (2011). The influence of exercise on cartilage in health and disease. In: *Proceedings of the 50<sup>th</sup> British Equine Veterinary Association Congress*, (Liverpool, U.K., September 7-10th, 2011). Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.ivis.org>.
7. Bramlage, L.R. (2011). Introduction to Joint Therapy. In *Proceedings of the 57th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* (San Antonio, Texas, USA, November 18-22nd, 2011). Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.ivis.org>.
8. Brehm, W., Burk, J., Delling, U., Gittel, C., Ribitsch, I. (2012). Stem-cell based tissue engineering in veterinary orthopaedics. *Cell & Tissue Research*, 347 (3), 677-688.

9. Burns, K. (2011). Stem Cells in theory & practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238 (4), 396-399.
10. Carter, G.K. (2009). Medical Treatment of Equine Foot Lameness. In: *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners Focus Meeting – Focus on the foot* (Columbus, Ohio, USA 2009). Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.ivis.org>.
11. Clegg, P.D. (2012). Musculoskeletal disease and injury, now and the future. Part 2: Tendon and ligament injuries. *Equine Veterinary Journal*, 44, 371-375
12. Clegg, P.D., Pinchbeck, G.L. (2011). Evidence-based Medicine and Stem Cell Therapy: How Do We Know Such Technologies are Safe and Efficacious?. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 373-382.
13. Csaki, C., Schneider, P.R.A., Shakibael, M. (2008). Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering. *Annals of Anatomy*, 190, 395-412.
14. de Mattos Carvalho, A., Alves, A.L.G., Gomes de Oliveira, P.G., Álvarez, L.E.C., Amorim, R.L., Hussni, C.A., Deffune, E. (2011). Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31 (1), 26-34.
15. Delling, U., Lindner, K., Ribitsch, I., Jülke H., Brehm, W. (2012). Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 76, 52-56.
16. Donald Gavin, M., Zachary, J.F. (2007). Acute Inflammation. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. (4<sup>th</sup> ed.). (101-108). USA: Mosby Elsevier.
17. Dysson, S. (2000). Lameness and Poor Performance in the Sports Horse: Dressage, Show Jumping and Horse Trials (Eventing). In *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2000*, vol. 46. Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.ivis.org>.
18. Fortier, L.A. (2009). Stem Cells for cartilage and tendon regeneration. In *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Congress of World Equine Veterinary Association*, (Guarujá,

- SP, Brazil, September 24-27<sup>th</sup>, 2009). Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.ivis.org>.
19. Fortier, L.A. (2011). Practical chondroprotective drug use. In: *Proceedings of the 50<sup>th</sup> British Equine Veterinary Association Congress*, (Liverpool, UK, September 7-10<sup>th</sup>, 2011). Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.ivis.org>.
20. Fortier, L.A., Smith, R.K.W. (2008). Regenerative Medicine for Tendinous and Ligamentous Injuries of Sport Horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24, 191-201.
21. Fortier, L.A., Travis, A.J. (2011) Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 2:9. Acedido em Jul. 5, 2012, disponível em <http://stemcellres.com/content/2/1/9>.
22. Fortier, L.A., McCarrel, T .M., Sundman, E.A., Schnabel, L.V., Cole, B.J., Boswell, S., Karas, V. Biologic Therapy for Joint Disease Platelet-Rich Plasma, Interleukin-1 Recetor Antagonist Protein/Autologous Condition Serum, and Bone Marrow Aspirate. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* (San Antonio, Texas, USA, November 18-22<sup>nd</sup>, 2011). Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.ivis.org>.
23. Frisbie, D.D. (2011). Stem Cells for Equine Joint Disease. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, (San Antonio, Texas, USA November 18-22<sup>nd</sup>, 2011). Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.ivis.org>.
24. Frisbie, D.D., Stewart, M.C. (2011). Cell-based Therapies for Equine Joint Disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 335-349.
25. Gattegno-Ho, D., Argyle, S., Argyle, D. (2011). Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. *The Veterinary Journal*, 191 (1), 19-27.
26. Getty, R. (1986). Sindesmologia (Artrologia) Generalidades e Miologia Geral. In *Sisson/Grossman anatomia dos animais domésticos*. (5<sup>a</sup> ed.). (33-46). RJ: Guanabara Koogan S.A.

27. Godwin, E.E., Young, N.J., Dudhia, J., Beamish, I.C., Smith, R.K.W. (2012). Implantation of bone marrow-derived stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*, 44 (1), 25-32.
28. Gutierrez-Nibeyro, S. (2011). Commercial Cell-based Therapies for Musculoskeletal Injuries in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 363-371.
29. Hale, B.W., Goodrich, L.R., Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W., Kisiday, J.D. (2012). Effect of scaffold dilution on migration of mesenchymal stem cells from fibrin hydrogel. *American Journal of Veterinary Research*, 73 (2), 313-318.
30. Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. (10<sup>a</sup> ed.). (238-240). RJ: Guanabara Koogan S.A.
31. Koch, T.G., Berg, L.C., Betts, D.H. (2008). Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *The Canadian Veterinary Journal*, 49, 1009-1017.
32. Koch, T.G., Berg, L.C., Betts, D.H. (2009). Current and future regenerative medicine – Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *The Canadian Veterinary Journal*, 50, 155-165.
33. Lacono, E., Brunori, L., Pirrone, A., Pagliaro, P.P., Ricci, F., Tazzari, P.L., Merlo, B. (2012). Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Society for Reproduction and Fertility*, 143, 455-468.
34. Lovati AB., Corradetti B., Cremonesi F., Bizarro D., Consiglio AL. (2012). Abstract de Tenogenic differentiation of equine mesenchymal progenitor cells under indirect coculture. *International Journal of Artificial Organs*, 35 (11), 996-1005.
35. Marfe, G., Rotta, G., De Martino, L., Tafani, M., Fiorito, F., Di Stefano, C., Poletti, M., Ranalli, M., Russo, M.A., Alessandra Gambacurta. (2012). A new clinical approach: Use of blood-derived stem cells (BDSCs) for superficial digital flexor tendon injuries in horses. *Life Sciences*, 90 (21-22), 825-830.
36. McCarthy, H.E., Bara, J.J., Brakspear, K., Singhrao, S.K., Archer, C.W. (2011). The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived

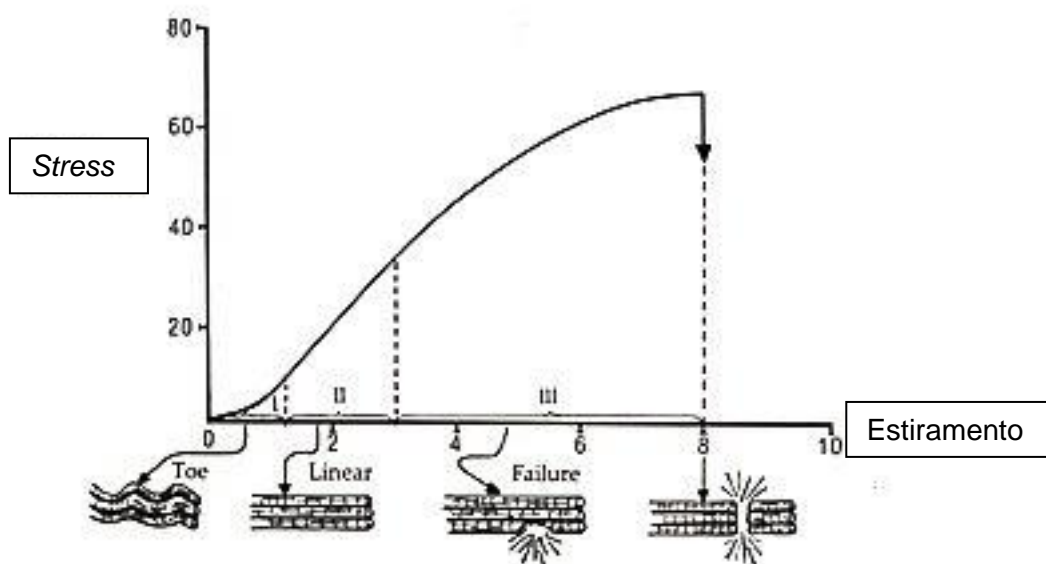
- stromal cells as potential cell sources for cartilage repair. *The Veterinary Journal*, 192 (3), 345-351.
37. McIlwraith, C.W. (2010). Management of Joint Disease in the Sport Horse. In *17th Proceedings of the 2010 Kentucky Equine Research: Feeding and Veterinary Management of the Sport Horse*, (Lexington, KY, abril 26-27, 2010), 61-75.
  38. McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Rodkey, W.G., Kisiday, J.D., Werpy, N.M., Kawcak, C.E., Steadman, J.R. (2011). Evaluation of Intra-articular Mesenchymal Stem Cells to Augment Healing of Microfractured Chondral Defects. *The Journal of Arthroscopy and Related Surgery*, 27 (11), 1552-1561.
  39. Milner, P.I., Clegg, P.D., Stewart, M.C. (2011). Stem Cell-based Therapies for Bone Repair. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 299-314.
  40. Nixon, A.J., Watts, A.E., Schnabel, L.V. (2012). Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery Board of Trustees*, 21(2), 278-294.
  41. Peroni, J.F., Borjesson, D.L. (2011). Anti-inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stem Cells. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 351-362.
  42. Raheja, L.F., Galuppo, L.D, Bowers-Lepore, J., Dowd, J.P., Tablin, F., Yellowley, C.E. (2011). Treatment of Bilateral Medial Femoral Condyle Articular Cartilage Fissures in a Horse Using Bone Marrow-Derived Multipotet Mesenchymal Stromal Cells. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31 (3), 147-154.
  43. Reed, S.A, Johnson, S.E. (2012). Refinement of Culture Conditions for Maintenance of Undifferentiated Equine Umbilical Cord Blood Stem Cells. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (6), 360-366.
  44. Ribitsch, I., Burk, J., Delling, U., Geißler, C., Gittel, C., Jülke, H., Brehm, W. (2010). Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine. In Scheper, T., Belkin, S., Doran, P. M., Endo, I., Gu, M.B., Hu, W.S., Mattiasson, B., Nielsen, J., Stephanopoulos, G.N., Ulber, R., Zeng, A.-P., Zhong, J.-J., Zhou, W. (Eds.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 123, 219-263 Springer.

45. Ross, M., Dysson, S. (2003). *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. USA: Saunders.
46. Ruggles, A.J., Advances in the Treatment of Equine Orthopedic Injury. In: *Proceedings of the Pre-Congress of the 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians* (Montesilvano, Italy February 4-6th, 2011). Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.ivis.org>.
47. Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G.R., Van Soon, A. (2010). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*, 75, 1431-1443.
48. Seo, J., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka H., Tabata, Y., Sasaki, N. (2012). Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatina/ $\beta$ -tricalcium phosphate sponges. *Research in Veterinary Science*, 93 (3), 1481-1486.
49. Sellnow, L. (2006). Tendons & Ligaments. In *The Horse* (setembro 2006). 47-52. Acedido em 1 de setembro de 2012, disponível em <http://www.TheHorse.com>.
50. Spencer, N.D., Gimble, J.M., Lopez, M.J. (2011). Mesenchymal Stromal Cells: Past, Present, and Future. *Veterinary Surgery*, 40, 129-139.
51. Stashak, T. (2002). *Adams' Lameness in Horses*. (5<sup>th</sup> ed.). (113-362). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
52. Stashak, T. (2002). Diseases of Joints, Tendons, Ligaments, and Related Structures. In *Adams' Lameness in Horses*. (5<sup>th</sup> ed.). (459-640). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
53. Stewart, M. (2011). Cell-based Therapies: Current Issues and Future Directions. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 393-399.
54. Stewart, M.C., Stewart, A.A. (2011). Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 243-261.

55. Tapp, H., Hanley, E.N., Patt, J.C., Gruber, H.E. (2009). Adipose-Derived Stem Cells: Characterization and Current Application in Orthopaedic Tissue Repair. *The Society for Experimental Biology and Medicine*, 234 (1), 1-9.
56. Taylor, S.E., Clegg, P.D. (2011). Collection and Propagation Methods for Mesenchymal Stromal Cells. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 27, 263-274.
57. URL: [www.horsejournals.com/equine-joint-disease](http://www.horsejournals.com/equine-joint-disease). Acedido em 1 de setembro de 2012.
58. Vidal, M.A., Robinson, S.O., Lopez, M.J., Paulsen, D.B., Borkhsenius, O., Johnson, J.R., Moore, R.M., Gimble, J.M. (2008). Comparison of Chondrogenic Potential in Equine Mesenchymal Stromal Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow. *Veterinary Surgery*, 37 (8), 713-724.

## Anexos

**Anexo I:** Representação gráfica da relação *stress*/estiramento de um tendão (adaptado de [pages.uoregon.edu](http://pages.uoregon.edu))



**Anexo II:** Diretrizes do sistema de graduação da claudicação em cavalos (AAEP) (adaptado de [www.aaep.org](http://www.aaep.org))

Grau de claudicação	Observações
0	Claudicação não é perceptível em nenhuma circunstância
1	Claudicação é difícil de observar e não é, aparentemente, consistente independentemente das circunstâncias (ex. quando montado, em círculo, em inclinação, em piso duro, etc.)
2	Claudicação é difícil de observar a passo ou no trote em linha reta mas é, aparentemente, consistente em certas circunstâncias (ex. em círculo, em inclinações, em piso duro, etc.)
3	Claudicação é observada de forma consistente no trote e em todas as circunstâncias
4	Claudicação é óbvia no passo
5	Claudicação leva um apoio mínimo do membro durante o movimento e/ou em repouso ou uma completa incapacidade de movimento




**Anexo III:** Procedimento para recolha de tecido adiposo: Protocolo do *Hippiatrica – Equine Medical Center*

A região da base da cauda é o local eleito para recolha de tecido adiposo. Os cavalos são sedados com a associação de xilazina e butorfanol (0.5 mg/kg de xilazina - Xilagesic 20%, Calier®; 0.01mg/kg de butorfanol - Botomidor, Richter pharma®). Realiza-se a tricotomia e assepsia do local, seguida por infiltração da pele e tecido subcutâneo com um anestésico local, mepivacaína (mepivacaína, Braun®), utilizando um bloqueio em linha (L-invertido). De seguida, é feita uma incisão de aproximadamente 5 cm paralela ao eixo da cauda, permitindo a visualização de uma camada de tecido adiposo subcutâneo. São recolhidos cerca de 30g de tecido adiposo, posteriormente armazenadas num frasco estéril de 50 ml, sendo a amostra inteiramente submersa em NaCl 0.9%. A pele é suturada com pontos simples, com recurso a um fio de sutura de ácido poliglicólico nº1 (PGA).

Material utilizado:

- Kit básico de cirurgia
- Lâmina de bisturi nº 11
- Luvas estéreis
- Compressas estéreis
- Fio de sutura PGA
- *Omnifix®* para proteção da ferida
- Algodão

**Anexo IV:** Protocolo e instruções para recolha, acondicionamento e envio de amostras para o laboratório da *FAT STEM* (referente ao kit para lesões de tendões e ligamentos)

	<b>FORM</b>	
<div><b>INSTRUCTIONS FOR USE</b> <b>PLATE-STEM</b></div>		
<p><b>Intended use:</b></p> <p>Fat-Stem provides an efficient stem cell therapy product named "Plate-Stem" for the treatment of equine suspensory ligament injuries for horses using implantation of an autologous stem cell product. Plate-Stem combines the benefits of platelet-rich plasma with the regenerative effect of stem cells. Implants of stem cells into core suspensors branch lesions result in the formation of tissue organisationally similar to ligament structure which is a novel biological and clinical approach.</p>		
<p><b>Collection of autologous horse material:</b></p> <p>Fat-Stem provides a kit for the collection of horse material, blood and adipose tissue. The following steps have to be done by the vet after diagnosis:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Send an e-mail to Fat-Stem ( <a href="mailto:info@fat-stem.com">info@fat-stem.com</a> ) mentioning the date that the kit is ready in your vet practice. (before 10 am for a pick up the same day)</li><li>2. After possible suppression of initial inflammatory reaction (using drugs, compression, cold therapy etc), a fat sample is taken at the tail basis (two tea spoons) under local anaesthetic and in aseptic sampling conditions. The fat tissue (20-30g) is transferred into a sterile tube which is available in the Fat-Stem kit.</li><li>3. At the same time 200 ml blood is taken from the horse and collected in the blood bag provided in the kit.</li><li>4. The blood and the fat biopsy are put into the kit separated by the blue gel pack and the ID form (horse identification) is filled in. Please stick the barcode label on the ID form, the blood bag and the fat tube. Keep the kit at room temperature.</li></ol>		
<p><b>Injection of the therapeutical stem cell product after 15 days</b></p> <p>The stem cell isolate (about 2 ml) will be shipped by Fat-Stem as an injectable suspension within 15 days after the sampling date. Under local anaesthesia and guided by ultrasonography the cells are injected into the lesion. A revalidation period of at least 6 months with controlled movements is essential and will improve the healing quality of the tendinopathy. Therefore subsequent echographies are advised to control the healing and to adapt the revalidation program.</p>		
FORM	Version 1	Page 1/1



FORM

## ANIMAL IDENTIFICATION AND INFORMED CONSENT PLATE-STEM

### 1. Information about the horse (please print) :

Official Name:

sex F/M

Nick Name of the horse

Date of birth:



### 2. Intent of use:

- For autologous therapeutical use, the material will be limited to respectively the horse itself, as intended recipient(s).

### 3. Declaration:

- I declare that the purpose and the collection procedure and the purpose of further processing by Fat Stem have been clearly explained.
- Possible risks and benefits including medical and other concerns, have been explained.
- I confirm that I have been properly informed and that I received and clearly understood all the information given, and I declare I am satisfied for all the information given. In addition, I have received sufficient time to consider the information and I have had the opportunity to ask questions, to which I have received satisfying answers by my veterinary doctor or his authorized representative giving the information

FORM

Version 1

Page 1/2



***"I herewith give my informed consent for blood collection and fat biopsy."***

Family Name:

Date signature (dd/mm/yyyy): / /20

**Signature of the veterinarian doctor or authorised representative:**

I declare that I apply Plate-Stem according to product specifications and accept that Fat-Stem is responsible for the product, but not for the therapy as such.

[illegible]

Date signature(dd/mm/yyyy):   /   / 20

**Signature or stamp:** \_\_\_\_\_

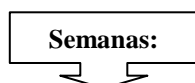
**Anexo V:** Formato geral do Plano de Reabilitação utilizado no *Hippiatrica – Equine Medical Center*

**Plano de Reabilitação**

**“NOME DO CAVALO”**

***Início:***

Semanas:
----------



1. Caminhar a passo por 30 min montado.
2. Caminhar a passo por 30 min montado, seguido de uma sessão de 10 min de: 3 min passo 1 min trote; finalizar com 25 min a passo.
3. Caminhar a passo por 30 min montado, seguido de uma sessão de 15 min de: 3 min passo 1 min trote; finalizar com 20 min a passo.
4. Caminhar a passo por 20 min montado, seguido de uma sessão de 25 min de: 3 min passo 1 min trote; finalizar com 20 min a passo.
5. Caminhar a passo por 15 min montado, seguido de uma sessão de 30 min de: 5 min passo 3 min trote e 1 min galope; finalizar com 20 min a passo.
6. Caminhar a passo por 15 min montado, seguido de uma sessão de 40 min de: 5 min passo 3 min trote e 1 min galope; finalizar com 15 min a passo.
7. Caminhar a passo por 15 min montado, seguido de uma sessão de 40 min de: 2 min passo 2 min trote e 2 min galope; finalizar com 15 min a passo.

**Hippiatrica**

*Equine Medical Center*

## Anexo VI: Relatório de R.M do caso clínico nº2



Moerbeke-Waas, 31-10-11

Spelonckvaart 46  
B-9180 Moerbeke-Waas  
tel + 32 9 346 76 18  
fax + 32 9 346 71 99  
mail : [info@bosdreef.be](mailto:info@bosdreef.be)  
URL : [www.bosdreef.be](http://www.bosdreef.be)

### **History :**

Request MRI RF foot/pastern.

### **Clinical exam :**

#### **MRI**

Sequences: RF foot

- T1 GE sag, front, trans
- T2 FSE trans / T2\* GE front
- STIR FSE sag, front

#### **Remarks**

- Thinning / erosion of the medial part of the cartilage of the DIP joint.
- hypointense signal intensity on all sequences in the medial palmar processes of the pedal bone.
- no significant DDFT, collateral ligament, nor navicular bone pathology.

Fetlock RF: T1 GE sag, front, trans / T2 FSE trans / STIR FSE front

#### **Remarks**

- minor bone densification in the subchondral bone of the dorsomedial part of the distal cannon bone.
- there's some diffuse increased STIR signal intensity in the midsagittal part of the proximal phalanx.

### **Conclusion :**

- 1/ Arthropathy of the DIP joint RF. Cartilage erosions.
- 2/ Bruising of the medial palmar process of P3.
- 3/ Bone bruising of the proximal phalanx.
- 4/ Minor arthropathy of the fetlock joint.

### **Treatment :**

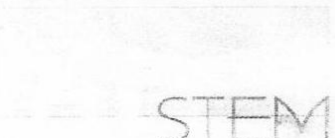
See together with Dr. Torrealba.

#### **Advise**

- IRAP treatment DIP joint.
- Tildren via regional perfusion.
- Rolling shoes.

If you require any supplementary information, do not hesitate to contact us.  
Thank you for referring this patient.

**Anexo VII:** Protocolo e instruções para recolha, acondicionamento e envio de amostras para o laboratório da **FAT STEM** (referente ao kit para lesões articulares)

	<p align="center"><b>FORM</b></p>
<p align="center"><b>INSTRUCTIONS FOR USE CHONDRO-STEM</b></p>	
<p><b>Intended use</b></p> <p>Fat-Stem provides an efficient stem cell therapy product named "Chondro-Stem" for the treatment of focal osteochondral defects and subchondral lesions, cysts (in various joints) causing lameness in horses. Implantation of an autologous, adipose tissue stem cell-derived chondrogenic product improves manifestations of osteochondrosis: hyaline-like elastic, firm, translucent cartilage fills the peripheral area of the defect after 12 weeks. This type of hydrogel based implants is a novel biological and the injectable cell-seeded matrix should be delivered arthroscopically in the clinic. In case arthroscopy is not done/possible, an injection in the joint is advised.</p>	
<p><b>Collection of autologous horse material</b></p> <p>Fat-Stem provides a kit for the collection of horse blood and adipose tissue. The following steps have to be done by the vet after diagnosis:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Send an e-mail to Fat-Stem ( <a href="mailto:info@fat-stem.com">info@fat-stem.com</a> ) mentioning the date that the kit is ready in your vet practice. (one day up front or at least before 10 am for a pick up the same day)</li> <li>2. A fat sample is taken at the tail basis (two tea spoons) under local anaesthetic and in aseptic sampling conditions. The fat tissue (20-30g) is transferred into a sterile tube which is available in the Fat-Stem kit. <u>Keep the samples at 4-8°C.</u></li> <li>3. At the same time 200 ml blood is taken from the horse and collected in the blood bag provided in the kit.</li> <li>4. The blood and the fat biopsy are put into the kit separated by the blue gel pack (frozen) and the ID form (horse identification) is filled in. Please stick the barcode label on the ID form on the blood bag and on the fat tube.</li> </ol>	
<p align="center">FORM</p>	<p align="center">Version 1</p>
<p align="right">Page 1/1</p>	



**Anexo VIII:** Kits comerciais disponibilizados pela *FAT STEM* para o acondicionamento e envio de amostras para laboratório

(A) Aplicação em lesões de tendões e ligamentos



(B) Aplicação em lesões articulares



*Texto escrito conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de 1990 - convertido pelo Lince.*